ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 19
1970

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 19 1970 NUMÉRO 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (1), 5-16.

SYNTHÈSE ET COUPLAGE DES DEUX CONSTITUANTS DE LA THIAMINE PAR LA LEVURE

Andrée OURNAC

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

L'auteur examine les possibilités de synthèse puis de couplage des deux constituants, pyrimidique et thiazolique, de la thiamine par la levure au cours de la fermentation alcoolique des sucres.

Il apparaît que la levure est capable d'unir les deux constituants de la thiamine avec un rendement limité, de synthétiser le dérivé thiazolique avec un rendement plus faible et d'élaborer de très petites quantités de dérivé pyrimidique.

En conséquence, la synthèse de la thiamine qui a lieu au cours de la fermentation de jus de raisin ou de jus synthétiques, et dont le rendement est généralement faible, serait limitée par l'élaboration du dérivé pyrimidique.

Par contre, en milieu aérobie, la levure élabore des quantités importantes des deux dérivés et par suite de thiamine.

INTRODUCTION

Ces essais font partie d'une étude générale sur le comportement des levures envers la thiamine au cours de la fermentation alcoolique des sucres. Ayant constaté (Ournac et Flanzy, 1967) une élaboration de thiamine par la levure au cours de la fermentation du jus de raisin, on veut essayer de déterminer le processus par lequel s'effectue cette élaboration. On va examiner ici les possibilités de synthèse et de couplage des 2 constituants de la thiamine : pyrimidique et thiazolique.

Un certain nombre de chercheurs, Harris et Yavit (1957), Leder (1959), Camiener et Brown (1959, 1960), Nose *et al.* (1959, 1961), Suzuoki et Kobata (1960), ont établi presque en même temps que la biosynthèse de la thiamine

paraît être accomplie par la formation initiale de ses deux constituants, pyrimidiqu et thiazolique, par un procédé de synthèse indépendant, suivie de leur couplage, ce deux constituants étant :

4 méthyl-5 (hydroxyéthyl) thiazole,
2 méthyl-6 amino-5 hydroxyméthyl pyrimidine.

Le couplage s'effectue en présence d'enzymes provenant des levures, d'ATI et d'ions Mg^{++} ; il a lieu entre le pyrophosphate du dérivé pyrimidique et le mono phosphate du dérivé thiazolique. Pour CAMIENER et BROWN (1960) d'autres composé pyrimidiques renfermant dans leur molécule, à la place du groupement hydroxy méthyl, les groupements : amino-méthyl, bromo-méthyl, méthoxyméthyl, peuvent être utilisés par le système enzymatique pour la synthèse de la thiamine ; ils sont préalablement convertis enzymatiquement en dérivés comportant le groupement hydroxyméthyl.

Mais si le mécanisme du couplage des deux intermédiaires thiaminiques est bien établi, les capacités, ainsi que les détails de la biosynthèse de ces intermédiaires par les levures, sont encore mal connus. En effet, d'après :

1. les résultats de SCHULTZ *et al.* (1937) relatifs à la vitesse de la fermentation alcoolique, selon lesquels le constituant pyrimidique seul a la même action accélératrice sur cette vitesse que la thiamine entière, tandis que le constituant thiazolique est inactif ;

2. les résultats de MOSES et JOSLYN (1953) relatifs à la croissance de la levure qui sont les suivants : la partie thiazolique ne provoque aucune augmentation de croissance pour une souche expérimentée de *Saccharomyces cerevisiae*, par rapport à celle obtenue dans un milieu déficient à la fois en vitamine B_1 et B_6. La partie pyrimidique produit un supplément de croissance égal aux 2/3 de celui imputable soit à la thiamine entière, soit aux dérivés pyrimidique et thiazolique associés ; il semble que les levures aient uniquement besoin d'un apport de dérivé pyrimidique, donc qu'elles sont capables de synthétiser le dérivé thiazolique.

Par contre, si on examine les travaux de VAN LANEN *et al.* (1942) qui signalent : « En milieu aéré, les levures de boulangerie en voie de croissance sont capables d'élaborer la thiamine à partir de ses deux constituants se trouvant en quantité équimoléculaire, une limite de couplage existant cependant. En milieu non aéré, un faible pourcentage seulement des intermédiaires est converti en thiamine. L'addition du dérivé pyrimidique seul ne provoque pas d'accroissement significatif de la synthèse thiaminique, mais quand le thiazole seul est ajouté la synthèse est augmentée. »

— ainsi que ceux de ODINZOVA (1943), d'après lesquels de nombreuses espèces de *Saccharomyces* élaborent de la thiamine à partir du dérivé thiazolique, et cela en quantité presque équimoléculaire de celle du thiazole ajouté, il apparaît que la levure est davantage capable de synthétiser le dérivé pyrimidique à partir des constituants du milieu que le dérivé thiazolique.

VAN LANEN *et al.* essayent ensuite un grand nombre de corps comme substituants soit du thiazole, soit de la pyrimidine ; aucun d'entre eux n'a stimulé la synthèse de la thiamine.

Étant donné ces résultats, dont les divergences résultent peut-être de conditions d'étude différentes (composition du milieu — pH — agent de fermentation

utilisé), nous avons essayé d'abord de fixer la quantité de thiamine que peuvent élaborer les levures présentes sur le raisin, c'est-à-dire *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, dans les conditions de la fermentation alcoolique du jus de raisin, puis de déterminer dans quelles proportions elles peuvent synthétiser et coupler les deux constituants de la thiamine.

PROTOCOLE DES ESSAIS

Nous avons opéré sur milieu synthétique et sur jus de raisin frais. Le milieu synthétique est moins favorable à la croissance et à l'activité fermentaire de la levure que le milieu biologique naturel constitué par le jus de raisin frais ; il permet cependant de mieux apprécier les capacités de la levure. Ce milieu est identique à celui utilisé par LAFOURCADE (1954), nous avons seulement remplacé l'acide citrique par l'acide tartrique à la dose où il est présent dans le jus de raisin, son pH est voisin de 3. Les levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (variété *ellipsoïdeus*) ont des origines différentes. Les levains proviennent de levures isolées sur milieu solide et mises à fermenter dans du jus de raisin désulfité et enrichi de 100 mg par litre de phosphate de NH_4 et de 500 mg par litre de « Yeast extract Difco » qui apportent au milieu 120 µg de thiamine par litre. Ces conditions d'élaboration du levain ont été fixées d'après les résultats obtenus au cours d'une étude précédente (OURNAC 1969) ; les levures ainsi produites renferment de 6 à 10 mg de thiamine par 100 g de poids sec, et leur activité fermentaire est influençable par la thiamine présente dans le milieu. L'ensemencement est réalisé à raison de $2 \cdot 10^6$ ou $10 \cdot 10^6$ germes par ml pour les jus synthétiques et $10 \cdot 10^6$ pour tous les jus frais. Les constituants de la thiamine nous ont été fournis par HOFFMANN-LA ROCHE ; ce sont :

— 2 méthyl-4 amino-5 amino méthyl pyrimidine dichlorhydrate, qui est identique pour la levure au 2 méthyl-6 amino-5 hydroxyméthyl pyrimidine, vrai constituant de la thiamine, et le

— 4 méthyl-5 (β hydroxy éthyl) thiazole.

On ajoute 0 à 600 µ g/l de thiamine entière ainsi que les quantités correspondantes des dérivés pyrimidique et thiazolique, ensemble puis séparément. On exprime toujours les dérivés en µg de thiamine correspondant. Une molécule de thiamine étant constituée d'une molécule de dérivé pyrimidique et d'une molécule de dérivé thiazolique, à 100 µg de chlorhydrate de thiamine correspondent 62,6 µg du dérivé pyrimidique (dichlorhydrate) et 42,4 µg du dérivé thiazolique.

Dès la fin de la fermentation, la thiamine est dosée par la méthode au thiochrome, telle qu'elle est décrite par OURNAC et FLANZY (1957), séparément dans le vin clair et dans les lies ; on obtient ainsi la thiamine totale que l'on exprime par litre de vin. La thiamine apportée par le levain est évaluée et retranchée. Nous avons de plus considéré le cas de fermentations aérées, l'aération étant réalisée par l'agitation continuelle d'un volume restreint de jus dans un grand récipient : 500 ml de jus sont mis à fermenter dans un erlenmeyer de 2 litres de capacité.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. *Jus synthétiques* (tabl. 1 et 2)

1° *Jus non enrichis : élaboration de thiamine.*

Au cours de la fermentation d'un milieu synthétique totalement dépourvu de thiamine, la levure en élabore de 20 à 46 µg par litre.

TABLEAU I

Jus synthétique

Corps ajoutés exprimés en µg/l de thiamine	Levure n° 1 $2 \cdot 10^6$/ml		Levure n° 1 $10 \cdot 10^6$/ml		Levure n° 2 $2 \cdot 10^6$/ml		Levure n° 3 $2 \cdot \cdot 10^6$/ml		Levure n° 3 $10 \cdot 10^6$/ml		Levure n° 4 $2 \cdot 10^6$/ml	
	Thiamine totale vin + lies en µg/l	p. 100 thiamine retrouvée	Thiamine totale en µg/l	p. 100 thiamine retrouvée	Thiamine totale en µg/l	p. 100 thiamine retrouvée	Thiamine totale en µg/l	p. 100 thiamine retrouvée	Thiamine totale en µg/l	p. 100 thiamine retrouvée	Thiamine totale en µg/l	p . 10 thiamine retrouvée
Thiamine												
0	46		20		32		43		32		20	
50	48	96	53	106			48	96	47	94	46	92
100	85	85	92	92			69	69	74	74	80	80
200	167	84			180	90	141	70	131	65	164	82
600	474	79	467	78	506	84	392	65	422	70	441	74
Pyri. + Thiaz.												
100	78	78					74	74	62	62	93	93
200	144	72			120	60	136	68	92	46	146	73
600	347	58					373	62	248	41	213	36
Pyrimidine												
100	81	81	71	71			69	69	51	51	70	70
200	126	63			110	55	85	43	48	24	93	47
600	138	23	130	22			95	16	64	11	90	15
Thiazole												
200	4	2			29	15						
600							28	4,6	10	1,7	26	4,3

2° *Jus additionné de thiamine : conservation de la thiamine exogène.*

Les jus additionnés de doses croissantes de thiamine nous permettent de connaître le pourcentage de vitamine utilisée ou détruite pendant la fermentation. Il apparaît une disparition d'autant plus importante que la quantité présente au départ est plus élevée, comme le montre le tableau suivant :

Thiamine ajoutée en µg/l	p. 100 de thiamine retrouvée	p. 100 moyen de la thiamine retrouvée
50	90 à 100	95
100	70 à 100	85
200	65 à 90	80
600	65 à 85	75

3° *Jus additionné des dérivés pyrimidique et thiazolique : couplage des deux dérivés.*

La levure est capable de réunir ces deux corps pour former la thiamine, mais le couplage n'est pas quantitatif et son rendement diminue lorsque la quantité des deux dérivés ajoutés augmente. Ce rendement est de 75 à 95 p. 100 pour 100 µg/l, 60 à 70 p. 100 pour 200 µg/l, 35 à 60 p. 100 pour 600 µg/l.

La levure possède donc un pouvoir de couplage des deux constituants de la thiamine assez limité.

TABLEAU 2

Pourcentage de thiamine conservée et élaborée

Corps ajoutés exprimés en µg/l de thiamine	Jus synthétique	Jus frais naturel	Jus frais ensemencé
	p. 100 conservation de la thiamine ajoutée		
Thiamine			
50	90 à 100		
100	70 à 100		
200	65 à 90	65 à 90	90 à 100
600	65 à 85	75 à 85	90 à 100
	p. 100 couplage des deux constituants		
Py. + thy.			
100	75 à 95		
200	60 à 70	48 à 58	65 à 100
600	35 à 60	25 à 65	70 à 90
	p. 100 élaboration du dérivé thiazolique		
Pyrimidine			
100	70 à 80		
200	45 à 65	5 à 20	20 à 37
600	15 à 25	5	6 à 35

Pour tenir compte de la thiamine qui a pu être utilisée après son élaboration, o peut calculer le rendement du couplage par rapport à la thiamine retrouvée dans l vins provenant de jus enrichis ; on obtient les chiffres suivants :

Py. + th. ajoutés (en µg thiamine/litre)	p. 100 de couplage
100	85 à 100
200	70 à 95
600	50 à 95

Le pourcentage de couplage devient plus important, le couplage serait quant tatif dans de nombreux cas, mais il a toujours tendance à être plus faible pour d quantités de dérivés ajoutés plus élevées.

4° *Jus additionné du dérivé pyrimidique seul : élaboration du dérivé thiazolique.*

L'addition du dérivé pyrimidique provoque une production de thiamine dans l vin obtenu, mais cette production est beaucoup plus faible que celle qui correspon à la totalité du dérivé ajouté. De plus, le rendement diminue rapidement lorsque l doses du dérivé pyrimidique ajouté augmentent. Pour des additions de 100, 200 e 600 µg/l, les rendements varient respectivement entre 90 et 100, 60 et 75, 20 et 3 La levure peut donc élaborer le dérivé thiazolique, mais dans des proportions asse restreintes. Il semble qu'il existe une limite d'élaboration ; en effet, au-delà d'un addition de 200 µg par litre, l'élaboration ne progresse presque pas.

5° *Jus additionné du dérivé thiazolique seul : élaboration du dérivé pyrimidique.*

La levure est à peu près incapable de fabriquer le dérivé pyrimidique et d'utilise le dérivé thiazolique pour l'élaboration de la thiamine.

6° *Importance de l'ensemencement.*

Pour un ensemencement plus important (10 millions de germes par ml au lie de 2), les pourcentages de couplage des deux constituants et d'élaboration du dériv thiazolique sont légèrement plus faibles ; ce phénomène a déjà été constaté par VA LANEN *et al.* (1942) avec des levures de boulangerie.

7° *Influence de l'aération* (tabl. 3).

Dans les essais aérés, on constate une forte élaboration de thiamine dans l milieu dépourvu de vitamine B_1 au départ, ainsi que dans le milieu additionné d dérivé thiazolique, ce qui montre que, dans ces conditions, la levure est capable d synthétiser le dérivé pyrimidique alors qu'elle en est à peu près incapable en anaéro biose. De plus, la synthèse du dérivé thiazolique dans les essais enrichis en dériv pyrimidique est plus importante que celle ayant lieu en l'absence d'air.

On peut donc penser que la synthèse des enzymes responsables de l'élaboratio des précurseurs de la thiamine est activée en aérobiose.

Toutefois, la synthèse de la thiamine, par formation de pyrimidine après addi tion de thiazole, ne correspond pas quantitativement à la quantité de thiazole ajoutée plus cette quantité est élevée et plus le rendement est faible.

TABLEAU 3

Jus synthétique. Fermentations agitées.
Résultats obtenus dès la fin de la fermentation.
Ensemencement à 2.10⁶ germes par ml

Corps ajoutés en µ/l de thiamine	Levures .10⁶/ml	Lies des vins g/l	Thiamine des lies µg/l	Thiamine des vins µg/l	Thiamine totale lies + vins µg/l	Thiamine totale-thiamine ensemencement µg/l
		Essais témoins				
1. 0	85	12,05	88	10	98	95
2. Thiamine 200	111	10,98	147	69	216	213
3. Pyri. 200	87	8,60	98	49	147	144
4. Thiaz. 200	67	11,46	20	10	30	27
5. Thiaz. 600	75	10,29	20	10	30	27
6. Py. + Th. ... 200	83	10,78	118	69	187	184
		Essais agités				
7. 0	350	35,945	180	17	197	194
8. Thiamine 200	365	31,671	282	52	334	331
9. Pyri. 200	400	32,386	140	60	200	197
10. Thiaz. 200	430	31,738	130	27	157	154
11. Thiaz. 600	425	33,287	164	27	191	188
12. Py. + Th. ... 200	420	33,629	130	44	174	171

— L'ensemencement à 2-10⁶ germes par ml apporte 3 µg de thiamine par litre.

2. *Jus frais* (tabl. 4 et 5)

Les résultats sont qualitativement les mêmes que pour les jus synthétiques, mais avec des amplitudes différentes. Ceci tient au fait que la levure trouve en quantité suffisante dans le jus frais un grand nombre de corps qui lui sont utiles ou nécessaires et qu'elle est alors, d'une part moins sensible aux additions que l'on peut pratiquer et, d'autre part, trouve plus d'éléments qu'elle en a besoin pour l'élaboration de certains corps. Il faut aussi distinguer les jus naturels dans lesquels évolue la flore sauvage du raisin et les jus ensemencés au moyen d'un levain bien déterminé : pour les premiers les levures semblent avoir plus de besoins en thiamine que pour les seconds.

1° *Jus non enrichi : élaboration de thiamine.*

Selon le jus et la souche de levure utilisée on constate une élaboration de thiamine variable qui peut atteindre 35 p. 100 de la teneur initiale du jus.

2° *Jus additionné de thiamine : conservation de la thiamine exogène.*

Le pourcentage de la thiamine ajoutée que l'on retrouve en fin de fermentation varie de 65 à 90 pour les jus naturels, de 90 à 100 pour les jus ensemencés ; il est à peu près indépendant de la dose initiale, il est nettement supérieur à celui trouvé pour les jus synthétiques.

TABLEAU 4

Jus frais Listan

Corps ajoutés exprimés en µg/l de thiamine	Thiamine totale (vin + lies) en µg/l			Différence avec le jus initial			pourcentages		
	Jus naturel	Levure nº 3	Levure nº 1	Jus naturel	Levure nº 3	Levure nº 1	Jus naturel	Levure nº 3	Levure nº 1
							p. 100 d'élaboration		
	225	227	242	+ 45	+ 47	+ 62	25	26	34
Thiamine							p. 100 de conservation		
200	356	390	413	+ 176	+ 210	+ 233	88	100	116
600	687	766	847	+ 507	+ 586	+ 667	84	98	111
Py. + thiazole							p. 100 de couplage		
200	297	356	420	+ 117	+ 176	+ 240	58	88	120
600	310	650	700	+ 130	+ 470	+ 520	22	78	87
Pyrimidine							p. 100 d'élaboration thiazolique		
200	219	233	254	+ 39	+ 53	+ 74	20	26	37
600	211	218	267	+ 31	+ 38	+ 87	5	6	14
Thiazole							p. 100 d'élaboration pyrimidique		
600	249	260	305	+ 69	+ 80	+ 125	11	13	21

Jus initial : 180 µg/l de thiamine.
L'ensemencement à $10 \cdot 10^6$ germes par ml apporte : 20 µg/l pour la levure nº 1. 19 µg/l pour la levure nº 3.

TABLEAU 5

Jus frais Cinsault

Corps ajoutés exprimés en µgl de thiamine	Thiamine totale (vin + lies) en µgl			Différence avec le jus initial			Pourcentages		
	Jus naturel	Levure nº 5	Levure nº 6	Jus naturel	Levure nº 5	Levure nº 6	Jus naturel	Levure nº 5	Levure nº 6
							p. 100 d'élaboration		
	174	202	192	— 26	0	0	0	0	0
Thiamine							p. 100 de conservation		
200	332	390	380	+ 132	+ 190	+ 180	66	95	90
600	636	755	800	+ 436	+ 555	+ 600	73	92	100
Py. + thiazole							p. 100 de couplage		
200	297	333	353	+ 97	+ 133	+ 153	48,5	66,5	76,5
600	583	625	700	+ 383	+ 425	+ 500	64	71	83,5
Pyrimidine							p. 100 d'élaboration thiazolique		
200	208	273	242	+ 8	+ 73	+ 42	4	36,5	21
600	232	267	250	+ 32	+ 67	+ 50	5,5	11	8,5
Thiazole							p. 100 d'élaboration pyrimidique		
600	193	221	180	— 7	+ 21	— 20	0	3,5	0

Jus initial : 200 µg/l de thiamine.
L'ensemencement à $10 \cdot 10^6$ germes par ml apporte : 22 µg/l pour la levure nº 5. 12 µg/l pour la levure nº 6.

Dans un jus frais, les levures trouvent suffisamment de thiamine et n'éprouve pas le besoin de consommer celle qu'on ajoute.

3° *Jus additionné des dérivés pyrimidique et thiazolique : couplage des deux dérivé*

Il s'effectue avec un rendement assez élevé pour les jus ensemencés (65 100 p. 100), plus faible pour les jus naturels (20 à 65 p. 100 seulement). Pour les ju ensemencés, le rendement est supérieur à celui trouvé pour les jus synthétiques ; pou les jus naturels il est inférieur. La levure doit utiliser une partie de la thiamine qu'ell élabore ainsi. Si on calcule les rendements par rapport aux vins provenant de ju enrichis de la quantité correspondante en thiamine, on obtient des rendements d 85 à 100 p. 100.

4° *Jus additionné du dérivé pyrimidique : élaboration du dérivé thiazolique.*

Cette élaboration est faible, beaucoup plus faible que dans les jus synthétiques 5 à 20 p. 100 pour les jus naturels, 5 à 37 p. 100 pour les jus ensemencés.

5° *Jus additionné du dérivé thiazolique : élaboration du dérivé pyrimidique.*

Une faible élaboration du dérivé pyrimidique apparaît dans un des essais (tabl. 4) 10 à 20 p. 100 de la quantité théorique, et pas du tout dans l'autre (tabl. 5) Cette élaboration paraît être sous la dépendance de la levure utilisée et de la compo sition du jus frais.

6° *Influence de l'aération.*

Dans le milieu naturel en fermentation, l'aération ne provoque qu'une faibl augmentation de l'élaboration par la levure des dérivés pyrimidique et thiazoliqu de la thiamine. On peut penser que dans un milieu aussi complexe que le jus de raisi frais, l'oxygène active la biosynthèse d'autres enzymes que ceux qui interviennen dans la formation de la thiamine.

CONCLUSIONS

D'après les résultats obtenus, il apparaît que la levure, au cours de la fermentation anaérobie des sucres, est capable d'unir les deux constituants de la thiamine avec un rendement limité, de synthétiser le dérivé thiazolique pour l'unir au dérivé pyrimidique qui lui est offert avec un rendement encore plus faible, et d'élaborer de très petites quantités du dérivé pyrimidique. Ces résultats concordent bien avec ceux relatifs à la vitesse de fermentation, dans les cas où celle-ci est influencée par la thiamine ; on sait, d'après Schultz *et al.*(1937), que le dérivé pyrimidique seul accélère la fermentation dans les mêmes proportions que la thiamine entière, le dérivé thiazolique ne la faisant pas varier, ce qui laisse prévoir que la levure est capable d'élaborer le dérivé thiazolique et non le dérivé pyrimidique.

La synthèse de la thiamine qui a lieu dans les jus frais ou synthétiques, et dont le rendement est généralement faible, serait limitée par l'élaboration du dérivé pyrimidique. Cette élaboration dépendrait à la fois de la levure (la levure n° 1, par exemple, est celle qui élabore le plus de thiamine et qui possède le plus fort pouvoir de couplage

des deux constituants) et de la composition du jus (certains jus de raisin peuvent renfermer soit de faibles quantités de pyrimidine, soit des analogues utilisables par la levure qui les transforme avant le couplage).

En aérobiose, contrairement à ce qui se produit en anaérobiose, la levure élabore des quantités importantes de dérivé pyrimidique et par suite de thiamine.

Reçu pour publication en décembre 1969.

SUMMARY

SYNTHESIS AND COUPLING OF THE TWO CONSTITUENTS OF THIAMIN BY YEAST

The author examines the possibilities of synthesis, followed by coupling, of the two constituents of thiamin, pyrimidine and thiazole, by yeats during the alcoholic fermentation of sugars.

It seems that yeast is capable of joining the two constituents of thiamin with a limited yield, of synthesizing the thiazole ring with a weaker yield and of producing very small quantities of the pyrimidine ring.

Consequently, the synthesis of thiamin which takes place during the fermentation of grape juice or synthetic juices, and whose yield is generally weak, would be limited by the production of the pyrimidine derivative.

On the other hand, in an aerobic medium, yeast produces large quantities of the two derivatives, and thus of thiamin.

RESUMEN

SINTESIS Y UNION DE DOS CONSTITUYENTES DE LA TIAMINA POR LA LEVADURA

El autor examina las posibilidades de sintesis y luego de union de dos constituyentes, pirimidico y tiazolico, de la tiamina, por la levadura durante la fermentacion alcoholica de los azucares.

Se observa que la levadura es capaz de unir los dos constituyentes de la tiamina con un rendimiento limitado, de sintetizar el derivado tiazolico con un rendimiento aun menor, y de elaborar cantidades muy pequenas del derivado pirimidico.

En consequencia, la sintesis de la tiamina que se produce durante la fermentacion de jugo de uva o de jugos sinteticos, con un rendimiento generalmente bajo, estaria limitada por la elaboracion del derivado pirimidico.

Al contrario, en medio aerobio, la levadura elabora candidades importantes de los dos derivados y en consecuencia de tiamina.

RIASSUNTO

SINTESI ED ACCOPIAMENTO DEI DUE COSTITUENTI DELLA TIAMMINA CON IL LIEVITO

L'autore esamina le possibilità di sintesi e quindi di accoppiamento dei due costituenti, pirimidico e tiazolico, della tiammina con il lievito, in fase di fermentazione alcolica degli zuccheri.

Risulta che il lievito è capace di unire i due costituenti della tiammina con un rendimento limitato, di sintetizzare il derivato tiazolico con un rendimento più debole e di elaborare piccolissime quantità di derivato pirimidico.

Pertanto, la sintesi della tiammina, che ha luogo durante la fermentazione di succhi di uva o di succhi sintetici, e il cui rendimento è generalmente debole, sarebbe limitata dall'elaborazione del derivato pirimidico.

In ambiente aerobio invece, il lievito elabora delle quantità importanti dei due derivati e per conseguenza di tiammina.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CAMIENER G. W., BROWN G. M., 1959. The biosynthesis of thiamine and thiamine phosphates b extracts of bakers'yeast. *J. amer. chem. Soc.*, **81**, 3800.

CAMIENER G. W., BROWN G. M., 1960. The biosynthesis of thiamine. I. Enzymatic formation of thi mine and phosphate esters of the pyrimidine moiety of thiamine. *J. biol. Chem.*, **235**, 2404-2410.

HARRIS D. L., YAVIT J., 1957. Biosynthesis of thiamine. *Feder. Proc.*, **16**, 192.

LAFOURCADE S., 1954. Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alco lique des moûts de raisin. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 283-333.

LEDER I. G., 1959. The enzymatic synthesis of thiamine monophosphate. *Biochem. biophys. Re Commun.*, **1**, 63.

MOSES W., JOSLYN M. A., 1953. The equivalence of thiamine and pyridoxine for a strain of *Sacchar myces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **66**, 197-203.

NOSE Y., UEDA K., KAWASAKI T., 1959. Enzymic synthesis of thiamine. I. From pyrimidine an thiazole moieties by a cell free extract of yeast. *Biochim. biophys. Acta*, **34**, 277-279.

NOSE Y., UEDA K., KAWASAKI T., TWASHIMA A., FUJITA T., 1961. Enzymic synthesis of thiamin II. From pyrimidine and thiazole phosphates and the enzymic synthesis of pyrimidine mono and dipho phate, and thiazole monophosphate. *J. Vitaminol.* (Osaka), **7**, 98-114.

ODINZOVA E. N., 1943. Synthesis of Vitamin B_1 by cultivated yeasts from thiazole. *C. R. Acad. Sc* U. R. S. S., **41**, 250-251.

OURNAC A., FLANZY M., 1957. Localisation et évolution de la vitamine B_1 dans le raisin au cours d la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **6**, 257-292.

OURNAC A., FLANZY M., 1967. Enrichissement en vitamine B_1 des vins conservés au contact des lie *Ann. Technol. agric.*, **16**, 41-54.

OURNAC A., 1969. Influence de l'origine de la thiamine (levure ou milieu) sur la vitesse de la fermenta tion alcoolique. *Ann. Technol. agric.*, **18** (3), 187-198.

SCHULTZ A. S., ATKIN L., FREY C. N., 1937. Fermentation test for vitamine B_1. *J. amer. chem. So* **59**, 2457-2460.

SUZUOKI J., KOBATA A., 1960. *J. Biochem.* Tokyo, **47**, 262, d'après *The biosynthesis of vitamins an related compounds*. GOODWIN T. M., 1963. Acad. Press. London and New York.

VAN LANEN J. M., BROQUIST H. P., JOHNSON M. J., BALDWIN I. L., PETERSON W. H., 1942. Syn thesis of vitamine B_1 by yeast. *Industr. engng. Chem.*, **34**, 1244-1247.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (1), 17-27.

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES ASSOCIATIONS PROTÉIQUES DU GLUTEN DE BLÉ (1)

B. GODON

Station de Biochimie et Physicochimie des Céréales et de leurs Dérivés,
Le Noyer Lambert, 91 - Massy
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Ce travail a permis de vérifier d'abord l'hypothèse que les propriétés rhéologiques du gluten de blé ont leur origine dans les associations de ses protéines constitutives. Chaque genre d'associations a ensuite été étudié après isolement par une méthode de solubilisation dans l'acide acétique et de chromatographie sur gel de dextrane. Le rôle des liaisons hydrophobes semble particulièrement important dans la gluténine alors que la gliadine devrait essentiellement sa cohésion à l'existence de liaisons hydrogène et disulfures.

INTRODUCTION

L'étude des associations protéiques connaît des développements importants depuis quelques dizaines d'années. Mais, si ces travaux ont permis de relier les particularités de cette structure aux propriétés essentielles d'un certain nombre de protéines surtout d'origine animale, de telles recherches sont plus rares en ce qui concerne les protéines végétales, et notamment celles du blé.

Cependant les protéines de cette céréale possèdent la faculté de s'assembler pour donner un réseau élastique et tenace : le gluten. Ce complexe protéique possède ainsi des propriétés mécaniques comparables à celles de certaines protéines animales, mais il s'en différencie nettement par le fait qu'il n'existe pas sous la forme de réseau dans le milieu initial. La formation de celui-ci exige l'intervention d'actions mécaniques jointes à des conditions bien déterminées d'hydratation. Le gluten que l'on récupère, après élimination de l'amidon de la pâte, est constitué en très grande partie

(1) Résumé de l'exposé de la thèse de Doctorat ès Sciences physiques préparée sous la direction de M. L. Petit, Directeur de Recherches à l'I. N. R. A. et soutenue le 3 juin 1969 à la Faculté des Sciences de Paris, sous la présidence de M. le Professeur Champetier.

de protéines (80 p. 100) auxquelles s'ajoutent des lipides, des oses et des matières minérales : son hydratation est élevée puisque l'eau qu'il renferme représente 200 p. 100 de la matière sèche.

Étant donné l'importance industrielle et économique des propriétés de ce réseau glutineux, de nombreux travaux ont été effectués pour tenter d'approfondir les connaissances que nous en avons. Mais jusqu'à ces dernières années, aucune étude n'a permis de préciser l'origine des propriétés mécaniques du gluten. Ceci est dû au fait que d'une part les techniques étaient insuffisantes ou mal adaptées à ce problème et que d'autre part les diverses voies explorées ne se sont pas avérées fécondes.

Lorsque nous avons entrepris ce travail, une conception nouvelle apparaissait et, dès le début, nous avons pris comme hypothèse de travail que l'origine des particularités de ce réseau réside dans les possibilités d'agrégation des protéines. Depuis cette notion a conquis de nouveaux adeptes, mais jusqu'à l'heure actuelle elle n'a pu se traduire que par des hypothèses spéculatives, souvent partielles et sans grand fondement expérimental solide. Seul le schéma proposé par GROSSKREUTZ, à partir d'études de diffraction aux Rayons X et d'observations au microscope électronique donne quelques renseignements expérimentaux ; il suggère que le gluten serait constitué de couches protéiques liées à des feuillets lipidiques par l'intermédiaire de phospholipides. Il ne précise pas la structure des protéines. En ce qui concerne cette dernière, deux ensembles d'hypothèses peuvent se dégager, mais elles ne proviennent que de considérations théoriques. La première tendance peut être représentée par la conception de MEREDITH, qui considère le gluten comme une molécule géante formée d'un squelette protéique élastique capable de former des liaisons avec d'autres types de molécules. La deuxième tendance, représentée par TRACEY, voit dans le gluten une condensation d'un mélange de protéines entre lesquelles apparaîtraient divers types d'interactions qui entraîneraient la formation d'une masse viscoélastique et insoluble. Cette dernière conception semble mieux correspondre à certains faits observés, sans que l'on ait pu jusqu'alors apporter de preuves expérimentales à cette théorie.

On peut alors penser que les techniques modernes de la biologie moléculaire constituent un outil assez bien adapté maintenant à ce genre de problème. Nous les avons utilisées afin d'obtenir des précisions sur la nature et le rôle des interactions qui interviennent dans ces associations protéiques.

Les résultats auxquels ce travail a pu aboutir vont être exposés en indiquant :

1° les techniques qui nous ont permis d'isoler les associations protéiques constitutives du gluten ;

2° les caractères de chacun des groupes d'agrégats ;

3° la nature et le rôle des interactions qui interviennent aussi bien à l'intérieur de ces agrégats qu'entre eux.

I. — TECHNIQUES UTILISÉES

Notre étude a pu être essentiellement réalisée grâce à la mise en œuvre d'une technique originale issue de la combinaison de la solubilisation dans l'acide acétique centinormal et d'une chromatographie sur tamis moléculaire Séphadex G 100. Nous avons eu le souci constant de respecter le plus possible les associations protéiques au cours de toutes ces opérations. Pour ce faire, nous avons rejeté tout traitement thermique ou mécanique violent que certains autres auteurs utilisent

et nous avons retenu une agitation douce, pendant un temps prolongé (60 h), à une température suffisamment basse pour éviter des modifications. Dans ces conditions, 60 à 95 p. 100 des protéines sont dispersées, suivant les variétés de blé. Ensuite nous effectuons une chromatographie sur gel par passage, non pas d'un seul éluant comme cela se fait classiquement, mais de 3 éluants successifs : eau, acide acétique, ammoniaque (fig. 1). Les protéines de la dispersion acétique sont séparées en

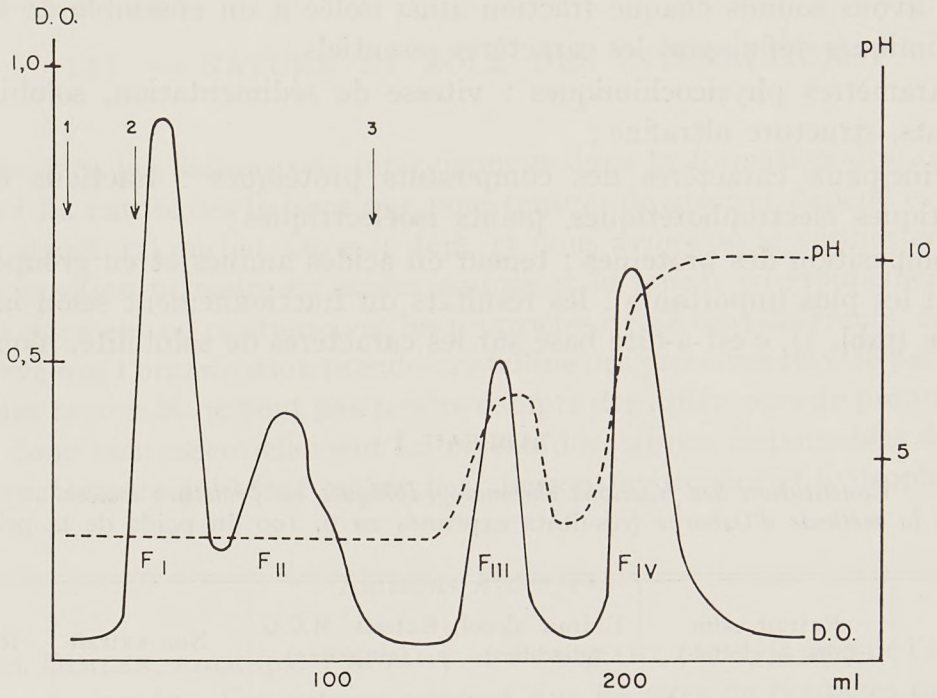


FIG. 1. — *Diagramme d'élution chromatographique*

4 fractions de sorte que, en tenant compte de la fraction non dispersée, le gluten total se trouve réparti entre 5 groupes protéiques (F_0, F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV}). F_I sort de la colonne juste au volume d'exclusion : cette fraction contient les plus grosses particules. F_{II} correspond à la zone de véritable tamisage, alors que les 2 autres fractions, retardées par des phénomènes d'adsorption et d'échanges d'ions, ne sont déplacées que par l'arrivée de l'acide acétique pour F_{III} et de l'ammoniaque pour F_{IV}. On observe que la séparation est bonne : seule la zone comprise entre F_I et F_{II}, correspondant au tamisage moléculaire, est moins bien définie. Après récupération séparée de chacune des fractions, on détermine la quantité de matières sèches qu'elle contient par élimination de l'eau à l'étuve. On peut alors obtenir la répartition de la matière sèche en pourcentage du poids de la prise d'échantillon. On remarque deux faits ; d'abord la récupération est quantitative, ensuite la répartition varie avec la variété de blé d'où provient le gluten.

Afin de bien préciser l'intérêt de cette technique dans l'étude présente, nous avons effectué une analyse statistique sur 16 variétés de blés pour comparer les quantités récupérées dans chaque fraction aux propriétés du réseau glutineux ; nous avons observé une très bonne corrélation entre la répartition chromatographique des protéines, plus particulièrement entre le rapport pondéral $\frac{F_0 + F_I + F_{IV}}{F_{II}}$ et les propriétés rhéologiques classiques des pâtes. Dans ce rapport, le terme prépondérant est $\frac{F_I}{F_{II}}$, car il possède la corrélation la plus élevée avec la ténacité ou le W. A la suite de ces résultats, nous pensons pouvoir considérer que ce fractionnement définit bien certaines caractéristiques structurales en relation avec les propriétés du réseau de gluten.

Par ailleurs, nous avons pu montrer que ce fractionnement est régi, en grande partie au moins, par l'état d'agrégation des protéines. En effet, nous avons eu recours à l'action des ultra-sons. Les vibrations ultrasonores utilisées ne peuvent entraîner la rupture de liaisons de forte énergie. Or, on observe des modifications importantes dans le comportement des fractions lors d'une 2e chromatographie après action des ultra-sons. Ceci est donc l'indice que des liaisons de faible énergie ont été rompues ; le comportement chromatographique est donc bien régi par l'état d'agrégation des molécules puisqu'il est modifié par les variations des interactions.

II. — CARACTÈRES DES AGRÉGATS

Nous avons soumis chaque fraction ainsi isolée à un ensemble de techniques physicochimiques définissant les caractères essentiels :

— paramètres physicochimiques : vitesse de sédimentation, solubilité, taille des agrégats, structure ultrafine ;

— principaux caractères des composants protéiques : fractions d'Osborne, caractéristiques électrophorétiques, points isoélectriques ;

— composition des protéines : teneur en acides aminés et en groupes soufrés.

Parmi les plus importants : les résultats du fractionnement selon la méthode d'OSBORNE (tabl. 1), c'est-à-dire basé sur les caractères de solubilité, montrent que

TABLEAU I

Constitution des fractions chromatographiques en protéines isolées par la méthode d'Osborne (résultats exprimés en p. 100 du poids de la prise)

	Extrait salin (alb. + globul.)	Extrait alcool (gliadines)	Extrait M.C.G. (gluténine)	Non extrait	Rendement
Gluten	3,2	47,7	40,0	1,0	91,9
Dispersion acétique	3,2	77,5	14,1	0,2	95,0
F_I	25,5	27,1	50,7	1,6	104,9
F_{II}	32,5	53,1	8,5	0,4	94,3

chaque fraction est hétérogène ; dans chacune d'elle, 1 ou 2 types de protéines prédominent : F_I contient en majorité de la gluténine alors que F_{II} est riche en gliadine. Les autres fractions F_{III} et F_{IV} n'ont pas pu être étudiées par cette technique à cause de la faible quantité de matériel qu'elles contiennent.

De même le diagramme d'électrophorèse en gel d'amidon montre de nettes différences de composition entre les fractions du gluten. Comme l'ont signalé ELTON et EWART, la gluténine ne migre pas. Nous ne pouvons donc observer dans les fractions F_I et F_{IV} que les composants autres que ceux de la gluténine. On constate que les mobilités électrophorétiques vont en croissant de F_I à F_{IV}. Si on compare ces mobilités à celles de chacune des fractions d'Osborne telles que les a décrites FEILLET on observe que les quelques bandes présentes dans F_I correspondent à celles de gliadines à faibles mobilités. Les constituants de F_{II} correspondent à un mélange de gliadines et d'albumines ou de globulines lentes ; ceux de F_{III} sont essentiellement des albumines et des globulines, alors que F_{IV} correspond aux bandes les plus rapides des globulines. Il est à noter surtout que des constituants de même mobilité peuvent se retrouver dans deux fractions voisines : un même constituant peut donc faire

partie de différents types d'agrégats car la qualité de la séparation chromatographique interdit des mélanges.

III. — NATURE ET RÔLE DES INTERACTIONS

Quelles sont les liaisons qui interviennent dans la formation des associations protéiques ? La nature des liaisons que nous tentons de préciser dépend évidemment du niveau structural en jeu. On sait déjà, et nous avons pu le vérifier nous-même, que la composition primaire en acides aminés et la teneur en groupements soufrés ne sont aucunement en relation avec les propriétés de glutens différents. Nous avons aussi observé que l'organisation pseudo-cristalline des protéines révélée par la diffractométrie des rayons X ne peut pas rendre compte des différences de propriétés.

C'est donc bien essentiellement au niveau des liaisons responsables de la structure dite quaternaire qu'il faut rechercher : liaisons hydrogène et hydrophobes.

Liaisons hydrogène

Wu et Dimler, ainsi que Daftary et Pomeranz, ont déjà signalé l'importance des liaisons hydrogène. Ces auteurs pensent que les sites de pontages intermoléculaires se situent au niveau des groupes amides, alors que Pence et Olcott attribuent la cohésion des gliadines aux liaisons hydrogène apparues entre des groupes thiols. En effet la présence de liaisons hydrogène est bien confirmée par le fait que la dispersion dans un milieu acétique dilué entraîne la rupture d'une partie de ce réseau. Les agrégats que nous pouvons observer dans la suspension seraient donc liés entre eux dans le réseau initial par l'intermédiaire de ces liaisons hydrogène. Comme nous l'avons vu, ces agrégats sont de taille et de constitution différentes. Mais on peut se demander si ces agrégats contiennent encore des liaisons par atomes d'hydrogène : pour le préciser nous avons soumis F_0 et F_I, les deux fractions les plus importantes aussi bien qualitativement que quantitativement, à l'action d'un rupteur de liaisons hydrogène, l'urée, et nous avons effectué un nouveau fractionnement de chacune d'elles. Il apparaît que le comportement de F_I n'est absolument pas modifié par la présence d'urée ; par contre F_{II} subit des modifications mais, fait surprenant, le transfert se fait vers la première fraction : il se forme donc des agrégats plus volumineux. Tout se passe comme si les plus gros agrégats (F_I) ne contenaient plus de liaisons hydrogène, au moins de liaisons accessibles à l'urée, ou qu'ils n'en contenaient pas en quantité suffisante pour que leur rupture modifie la conformation de ces agrégats. Par contre, les agrégats de F_{II} semblent en renfermer encore une certaine proportion et leur rupture permet la formation de gros agrégats par l'intervention d'autres forces de liaison.

De plus l'élimination des protéines solubles de la farine modifie nettement les caractères du gluten : on observe, surtout dans le cas des protéines salinosolubles, un renforcement de la structure puisque la S p. 100 devient plus faible et que F_I est plus important. Il est vraisemblable que ces protéines peuvent intervenir soit par pontage soit par influence sur des groupements polaires d'autres protéines comme, en particulier, les gliadines que nous avons vu associées aux protéines solubles dans F_{III}.

Liaisons hydrophobes.

Mais, de toute évidence, les liaisons hydrogène ne sont pas les seules présent puisque des agrégats subsistent après la mise en dispersion dans l'urée, donc apr la rupture des liaisons hydrogène. Or nous observons que le gluten formé en présen de milieux de forces ioniques supérieures à celle de l'eau acquiert des propriét particulières (tabl. 2). Nous avons en effet étudié des glutens préparés en présen d'une part de tampon phosphate Sorensen et, d'autre part, d'une solution de ClN 0,5 M que nous comparons au gluten préparé avec de l'eau distillée. Nous observo qu'il se forme une quantité plus importante de gluten et que celui-ci possède u solubilité plus faible. De sorte qu'il apparaît que la cohésion du réseau est renforcée celui-ci est moins sensible à l'action dispersante du milieu. Or, ces milieux à for ionique élevée favorisent essentiellement la formation des liaisons hydrophobes. O pourrait penser que les agrégats qui demeurent dans la dispersion doivent leur exi tence à la présence de telles liaisons.

Ceci est confirmé par les répercussions d'un traitement thermique sur les pr priétés des protéines, traitement qui, classiquement, est considéré comme favorab aux interactions hydrophobes et néfaste pour les liaisons hydrogène. En effet, l figure 2 montre une insolubilisation progressive de ces protéines lorsque les condi

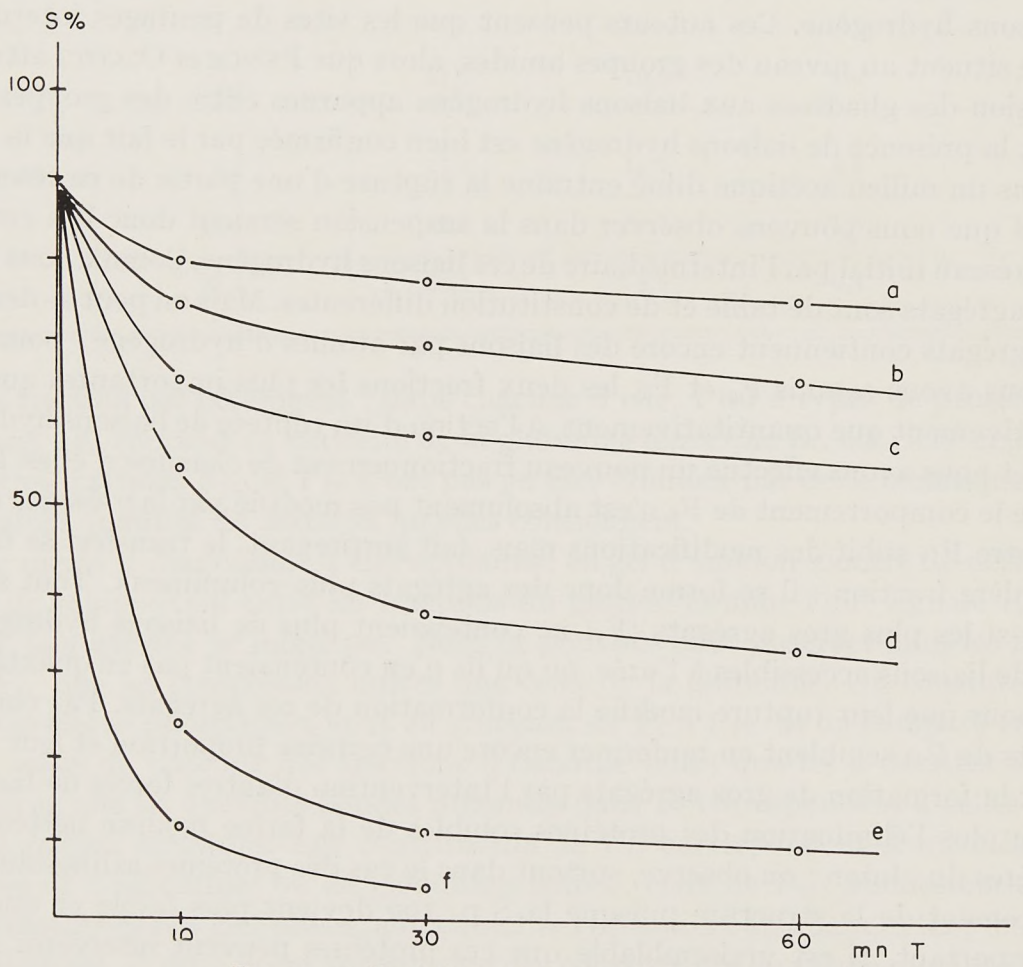


FIG. 2. — *Variations de la solubilité S p. 100 en fonction des conditions de chauffage: température*
a : 40°C *b* : 60°C *c* : 70°C *d* : 80°C *e* : 90°C *f* : 100°C

TABLEAU 2

Comportement des protéines de la farine lixiviée en présence de différents milieux

Échantillons	Variété *Étoile de Choisy*			Variété *Progress*		
Milieux utilisés	Eau distillée	Tampon phosphate	Solution de Cl Na	Eau distillée	Tampon phosphate	Solution de Cl Na
Quantité de gluten en p. 100 protéines initiales	69,8	88,6	91,5	65,2	80,5	92,6
Fractionnement des protéines totales						
Non gluten....%	30,3	11,4	5,5	34,8	19,5	7,4
F_0 .....%	10,6	12,4	46,2	9,4	11,0	44,3
F_I .....%	28,5	21,0	2,4	28,4	23,9	—
F_{II} .....%	19,0	32,8	36,8	21,2	21,6	45,2
F_{III} .....%	4,7	10,6	—	4,6	8,0	—
F_{IV} .....%	3,9	9,9	7,2	5,2	7,3	5,2
	96,9	98,1	98,1	103,6	101,3	102,1

tions de traitement (température et temps de chauffage) deviennent plus sévères.

Mais cette insolubilisation progressive n'affecte pas de la même façon les différents types d'associations : les constituants de F_I diminuent progressivement et disparaissent complètement à partir de 80°C. La diminution de ceux de F_{II} ne commence que lorsque les précédents ont disparu.

Ces faits suggèrent donc que la cohésion des agrégats que nous observons dans la dispersion est due à des interactions dont on n'a pas encore évalué l'importance dans le gluten : les interactions hydrophobes.

Nous avons encore examiné dans l'optique de ce travail deux points particuliers déjà étudiés par d'autres auteurs : le premier concerne l'intervention des groupes soufrés, le deuxième la participation des lipides à ce réseau.

Groupes soufrés

En général on considère qu'ils jouent un rôle important dans la structure du gluten par la formation de ponts disulfures intra ou intermoléculaires. Afin de mieux préciser leur rôle dans les fractions que nous avons isolées, nous avons étudié uniquement le comportement des 2 premières fractions, toujours à cause de la trop faible quantité des deux dernières, lorsqu'on fait agir sur elles des réducteurs pour couper les ponts disulfures. Les réducteurs choisis sont le bisulfite de sodium et la cystéine de façon à utiliser deux substances possédant des propriétés suffisamment différentes afin de pouvoir critiquer les interférences possibles avec l'action réductrice (tabl. 3).

TABLEAU 3

Action des réducteurs sur les fractions protéiques du gluten
(résultats en p. 100 du poids de la prise)

Fractions obtenues lors du 1er fractionnement	Témoin		Bisulfite de sodium		Cystéine	
	F_I	F_{II}	F_I	F_{II}	F_I	F_{II}
F_I	66,9 %	0	69,8	58,0	65,4	65,0
F_{II}	0	90,2	0	29,5	0	9,7
F_{III}	25,2	0	24,7	3,0	23,7	14,3
F_{IV}	7,7	8,5	5,2	9,2	9,2	7,9
	99,8	98,7	99,7	99,7	98,3	98,9

L'action de ces corps a d'ailleurs été semblable : lors du 2e fractionnement on observe que le comportement de F_I n'est pas modifié alors que celui de F_{II} l'est notablement.

Nous observons que la teneur en groupes soufrés, déterminée par ampérométrie, est nettement plus faible que celle des autres fractions ne contenant pas de gluténine. Cependant les analyses d'acides aminés soufrés montrent qu'elle en possède des quantités relativement importantes. Les groupes soufrés ne sont donc pas accessibles par la méthode ampérométrique. Il est à noter aussi que la fraction F_{II} se trouve déplacée vers F_I, comme si les protéines qui la constituent formaient des liaisons

ydrophobes à la suite de l'action des réducteurs, donc de la coupure des ponts disulfures.

Or, si l'on bloque les groupes sulfhydryles libres soit par le NEMI (N-éthylmaéimide) soit par le PCMB (parachloromercuribenzoate de Na), on observe une agrégation plus poussée qui se traduit par une insolubilisation partielle et un accroissement de la taille des plus gros agrégats. Il est certain que la présence de radicaux rganiques volumineux, à la place du groupe hydrophile SH, favorise l'intervention les interactions hydrophobes, entraînant ainsi cette agrégation. Ce doit donc être le hénomène qui existe normalement dans les agrégats F_I. Ainsi on peut formuler 'hypothèse que les résidus « cystéine » de F_I sont en grande partie intéressés par des iaisons hydrophobes et, ainsi, ne se trouvent pas sous forme de ponts disulfures ; ils ont alors masqués. On peut penser aussi que, après l'action des réducteurs, la rupture des ponts disulfures de F_{II} laisserait la possibilité aux résidus de cystéine d'intervenir dans ces liaisons hydrophobes. Il est vraisemblable que, suivant l'environnement, les groupes soufrés sont, soit bloqués dans des interactions hydrophobes (F_I), soit liés par des ponts disulfures (F_{II}). Cette hypothèse a l'avantage de pouvoir rendre compte de faits restés inexpliqués jusqu'alors.

C'est ainsi que récemment Ewart, pour rendre compte que des agrégats subsistent même après réduction de la gluténine, suggère l'existence de liaisons disulfures surtendues aboutissant à une juxtaposition des groupes soufrés. Cette juxtaposition pourrait précisément être le résultat d'interactions hydrophobes. De même l'hypothèse de De Deken sur l'inaccessibilité d'une certaine proportion de groupes SH peut alors s'expliquer par leur participation à des interactions de même nature.

La théorie des échanges entre ponts disulfures proposée par Bloksma n'est pas en contradiction avec notre hypothèse, bien au contraire, car les énergies de telles interactions sont plus faibles que celles des liaisons covalentes même faibles, comme les ponts disulfures auxquelles cet auteur fait appel. Les échanges se feraient donc plus facilement.

Lipides

Nous avons déjà dit que Grosskreutz a montré la participation de ces substances au réseau de gluten, sous forme de feuillets reliés aux protéines par les phospholipides, du moins dans le gluten étiré. Pour notre part, nous avons observé que l'élimination des lipides de la farine utilisée pour préparer le gluten occasionne des modifications importantes des caractères de ce gluten. L'élimination des lipides aussi bien libres que liés se traduit par une augmentation de F_0, de F_I et de F_{II}. On observe également que ce gluten est plus sensible à l'action des ultra-sons que le gluten non délipidé : en effet F_I disparaît et ses agrégats se reportent en F_{II}.

Ceci semble en accord avec l'hypothèse que les lipides constituent des plans de glissement qui peuvent absorber les radiations ultrasonores dans le gluten normal. Les observations en microscopie électronique nous ont montré que les lipides libres se situent surtout dans des zones fibrillaires riches en gluténine. Il est donc normal que leur élimination favorise la cohésion des plus gros agrégats.

L'ensemble de nos résultats peut alors être résumé dans le tableau suivant (tabl. 4). Le schéma de structure auquel nous arrivons représente le gluten comme formé par des agrégats de taille variable dans lesquels la cohésion serait maintenue essentiellement par les liaisons hydrophobes. Certains doivent aussi partiellement

leur conformation à des liaisons hydrogène (F_{III}) ou disulfures (F_{II}). Tous ces agré
sont liés entre eux dans le réseau natif par des liaisons hydrogène soit directe
soit par l'intermédiaire des protéines solubles. Ce schéma doit évidemment en

TABLEAU 4

Agrégats	Aspect microscopique	Constituants	Liaisons disulfures	Liaisons hydrogène	Liaisons hydrophobes
F_0	Zone fibrillaire Globules lipidiques	Gluténine Lipides	+		++
F_I	Zone fibrillaire	Gluténine Peu de lipides	+	+	++
F_{II}	Zone lisse	Gliadine	+	+	+
F_{III}	Zone lisse Zone fibrillaire granuleuse	Gliadine Albumines Globulines	+	+	
F_{IV}	Zone fibrillaire constituée de protéines dénaturées	Gluténine	+		++

L'association de ces agrégats se fait par l'intermédiaire de liaisons hydrogène.

être précisé mais il peut dès maintenant servir de point de départ à un certain nom
d'études concernant les propriétés rhéologiques des pâtes en espérant qu'il ouv
une voie nouvelle dans la connaissance de ces phénomènes.

Reçu pour publication en décembre 1969.

SUMMARY

PHYSICO-CHEMICAL STUDY OF THE PROTEIC ASSOCIATIONS OF WHEAT GLUTE

This work has at first permitted to verify the hypothesis that the rheological properti
the wheat gluten have their origin in the associations of the proteic components. Then, each
of association has been studied after isolation by a method of solubilization in the acetic
and of dextran-gel chromatography. The part of the hydrophobic bonds seems particularly im
tant in the glutenin, while the hydrogen and disulfur bonds should be responsible of the cohe
of the gliadin.

ZUSAMMENFASSUNG

ZUR PHYSIKALISCHEN-CHEMISCHEN UNTERSUCHUNG DER PROTEIN VEREIMGUNGEN DES WEIZENKLEBERS

Dieser Arbeit erlaubt zuerst dir Voranssetzung zu bestätigen dass die rheologischen Eigenchaften des Weizenklebers durch die Vereinigungen seiner bestandlichen Proteinen enstehen ede vereinigungsart wurde dann nach Isolierung durch eine methode von Auflssbarkeit in Essigaüre und durch gel-chromatographie auf Dextran untersucht. Die Rolle der hydrophoben Bindunen scheint von erheblicher Bedeutung in dem glutenin zu sein während der zusammenhalt des liadins mit dem Bestehen von Wasserstoff-und disulfid-bindungen wesentlich zusammenhängen ürde.

Ann. Technol. agric., 1970, 19 (1), 29-40.

MÉTHODE DE VINIFICATION PAR MACÉRATION CARBONIQUE

IV. — Influence de la température et de la durée de macération carbonique sur la qualité des vins secs élaborés a partir de « Grenache noir »

C. FLANZY, P. BÉNARD et S. AUBERT
avec la collaboration technique de P. Perry et J. Lardin

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, 84 - Monfavet
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Les influences respectives de la température et de la durée de macération carbonique sur la qualité de vins secs de *Grenache noir* ont été étudiées au cours des vendanges 1967 et 1968.
Des règles pratiques pour l'élaboration de ce type de vin sont proposées.

INTRODUCTION

L'étude de la vinification par macération carbonique, orientée par les travaux de M. Flanzy (1935), comprend, parallèlement à des travaux d'ordre théorique, l'accumulation de connaissances pratiques.

Les participants à ce programme ont pour but de conseiller des règles de conduite de cette vinification : règles issues à la fois de la pratique de celle-ci et des études théoriques qu'elle provoque.

La température et la durée de macération apparaissent comme deux des facteurs les plus importants intervenant au cours de l'élaboration de tels vins. Dans ces conditions, il paraît souhaitable de déterminer, en fonction du type de vin recherché

et du cépage utilisé, les conditions optimales de température et de durée de macé tion carbonique.

Ainsi, des essais ont été réalisés en 1967 et 1968 sur du *Grenache noir* du Doma expérimental de Pech-Rouge, en vue d'obtenir des vins rouges secs type *Ha Corbières*.

A. — TECHNIQUES

1. *Protocole expérimental*

De nombreuses similitudes existent entre les protocoles expérimentaux des deux essais. lot homogène de *Grenache noir* est équitablement partagé en 6 échantillons. Chaque échantil est placé, sans foulage préalable, dans une cuve de 6 hl en acier émaillé dont l'atmosphère a préalablement saturée de CO_2. Les cuves sont situées deux par deux dans 3 enceintes respecti ment thermorégulées à 15°, 25° et 35°C. Deux durées de macération sont réalisées pour cha température. Au pressurage (réalisé dans des conditions semblables pour tous les échantillon le mélange des moûts de goutte et de presse d'un même échantillon est replacé dans une cuve 6 hl afin d'achever la fermentation des sucres résiduaires. (Le réemploi de ces cuves, avec la cr tion d'un volume mort important et peu souhaitable, est dû au manque de récipients de fai capacité). Cette deuxième fermentation est conduite en 1967 à la température de la cave : 20-22 En revanche, en 1968, chaque fermentation finale est réalisée à la température de la macérat correspondante.

En 1968, un échantillon est vinifié à 25°C après foulage de la vendange et sulfitage à rais de 5 g de SO_2 par hectolitre de moût.

Après achèvement en cuves des fermentations alcooliques et malolactiques, les vins s conservés en bonbonnes ou en fûts.

2. *Analyses. Dégustations*

Les analyses des moûts et des vins sont réalisées selon les méthodes officielles (*Journal Offic* 1963, **63**, 154).

Chaque dégustateur affecte un échantillon d'une note globale incluant tous les critères dégustation. La note finale du vin correspond à la valeur moyenne des notes qui lui sont att buées par l'ensemble des dégustateurs.

B. — RÉSULTATS. DISCUSSION

1. *Le pourcentage de moût de goutte* par rapport au moût total (tabl. 1) croît av la température et la durée de macération. D'autre part, une cuvaison de 11 jours 25°C donne un rendement de jus de goutte légèrement supérieur à celui obtenu p 6 jours de macération à 35°C.

Les pourcentages de jus de goutte obtenus à partir du cépage *Grenache* (10 30 p. 100) sont très inférieurs à ceux relevés pour le *Carignan* (25 à 75 p. 100) da des conditions expérimentales assez proches (travaux en cours).

Ces résultats conduisent à formuler deux remarques :

1° contrairement à certaines observations antérieures (travaux personnels n publiés), les baies de *Grenache* semblent être relativement résistantes à l'éclateme sous l'effet de contraintes internes ou externes, dans les conditions expérimental retenues.

— *Conditions expérimentales*

Des lots homogènes de « Vendange entière » de *Grenache noir* sont encuvés sans foulage préalable dans des cuves de 6 hl dont l'atmosphère est saturée de CO_2. Ces cuves sont placées deux par deux dans trois enceintes dont la température est respectivement de 15°C, 25°C et 35°C. En 1968, un lot est vinifié après foulage de la vendange. La deuxième fermentation est conduite à 20°C en 1967 et à la température de la macération correspondante en 1968.

— *Expression des résultats*

MC : Vinification avec macération carbonique. VF : Vinification en vendange foulée. Poids de vendange et de marc sont donnés en kg. Les durées de macération et de seconde fermentation correspondent à des jours. La fin de la deuxième fermentation est arbitrairement fixée au moment où les densités des vins atteignent 995. Les volumes de moût sont mesurés en litres. Le rapport ρ du jus de goutte au jus total est exprimé en p. 100.

Année	N° cuve	Type de vinification	Poids vendange	θ°C de macération	Durée de macération	Volume de moût			ρ $\frac{G \times 100}{G + P}$	Poids du marc	θ°C de 2° fermentation	Durée de 2° fermentation
						Goutte	Presse	Mélange				
1967	1	MC	350	35	6	47	185	232	20	78,6	20-22	
	2	MC	350	35	10	63	175	238	26,5	72	20-22	
	3	MC	350	25	6	37	185	222	17	85,9	20-22	
	4	MC	350	25	11	53	182	235	22,5	77,5	20-22	
	5	MC	350	15	7	25	195	220	11	96,1	20-22	
	6	MC	350	15	12	35	213	248	14	70	20-22	
1968	7	MC	334	35	6	29	180	209	14	98,5	35	7
	8	MC	334	35	11	50	155	205	24	99	35	8
	9	VF	334	25	6	144	67	211	68	70	25	2
	10	MC	334	25	11	42	163	205	20	82	25	5
	11	MC	334	15	12	21	185	206	10	95	15	10
	12	MC	334	15	19	37	168	205	18	114	15	8

TABLEAU 2

Analyses sommaires des différents moûts au pressurage

— *Conditions analytiques*

Au pressurage, des échantillons de moût de goutte, de moût de presse et du mélange final de ces moûts sont prélevés et fixés avec une solution aqueuse concentrée d'anhydride sulfureux. Les analyses de moûts sont effectuées sur ces échantillons.

— *Expression des résultats*

Les lettres G, P, M désignent respectivement : moût de goutte, moût de presse et moût d'assemblage goutte + presse.
Le degré alcoolique en puissance est calculé sur la base de 17 g de Sucres pour 1° d'alcool éthylique.
Les signes + et —, dans la colonne « Fermentation malolactique » indiquent respectivement : + que cette fermentation est terminée ; — qu'elle n'a pas encore débuté.

Année	N° cuve	Type de vinification θ°C durée	Goutte Presse Mélange	*d*	Degré Alcool Acquis	Sucres	Degré Alcool Puissance	Degré Alcool Total calculé	AT	AV	pH	Fermentation malolactique
1967	1	MC 35 6	G	1 022	8°94	47,2	2°71	11°65	3,40	0,14	—	+
			P	1 073,5	5°25	109	11°51	16°76	2,85	0,19	—	+
			M	1 060	6°20	154,1	9°00	15°20	2,85	0,14	—	+
	2	MC 35 10	G	1 015	10°76	38,8	2°22	12°98	3,10	0,19	—	+
			P	1 053,5	7°76	147,1	8°59	16°35	2,60	0,11	—	+
			M	1 044	8°35	117,1	6°88	15°23	2,80	0,19	—	+
	3	MC 25 6	G	1 044,7	6°95	97,9	5°70	12°65	3,40	0,20	—	En cours
			P	1 065	6°38	171,6	10°03	16°41	3,00	0,19	—	—
			M	1 074	4°66	191,6	11°21	15°88	3,40	0,19	—	En cours
	4	MC 25 11	G	1 006	10°99	14,0	0°78	11°77	3,10	0,11	—	+
			P	1 056	7°11	151,2	8°83	15°94	2,50	0,13	—	+
			M	1 047,5	7°70	122,9	7°17	14°87	2,60	0,12	—	+
	5	MC 15 7	G	1 067,5	5°13	161,4	9°43	14°56	3,50	0,31	—	En cours
			P	1 087	3°16	223,0	13°05	16°21	3,20	0,18	—	En cours
			M	1 072	5°29	173,8	10°16	15°34	3,10	0,15	—	En cours

TABLEAU 2 (*suite*)

Année	N° cuve	Type de vignification θ°Cdurée	Goutte Presse Mélange	*d*	Degré Alcool Acquis	Sucres	Degré Alcool Puissance	Degré Alcool Total calculé	AT	AV	pH	Fermentation malolactique
	7	MC 35 6	G	1 022	9°63	32,4	1°84	11°47	3,80	0,26	3,94	—
			P	1 087	4°11	203,7	11°92	15°03	3,20	0,22	3,65	—
			M	1 086	4°21	198,0	11°60	14°81	3,70	0,20	3,68	—
1968	8	MC 35 11	G	1 009	10°07	9,8	0°52	10°59	3,60	0,26	3,98	+
			P	1 056	7°37	134,2	7°83	15°20	3,00	0,23	3,85	+
			M	1 043	8°06	103,5	6°03	14°06	3,20	0,23	3,88	+
	9	VF 25 6	G	996,6	14°72	5,3	0°25	14°97	3,50	0,26	3,77	—
			P	1 011,0	14°14	23,4	1°32	15°46	3,60	0,30	3,82	—
			M	1 003,0	14°67	11,9	0°63	15°30	3,50	0,28	3,79	—
	10	MC 25 11	G	1 004,0	11°25	7,9	0°40	11°65	3,40	0,23	3,90	+
			P	1 066,0	7°07	159,2	9°30	16°37	2,90	0,23	3,60	—
			M	1 058,0	7°61	142,1	8°30	15°69	2,90	0,23	3,62	—
	11	MC 15 12	G	1 014,5	10°66	16,4	0°96	11°62	3,60	0,19	3,90	En cours
			P	1 083,7	4°22	199,1	11°65	15°87	3,40	0,19	3,60	En cours
			M	1 077,6	4°67	182,0	10°64	15°31	3,40	0,19	3,62	En cours
	12	MC 15 19	G	1 007,5	11°15	8,5	0°48	11°63	3,40	0,20	3,95	En cours
			P	1 065,4	6°63	154,1	9°00	15°63	3,00	0,24	3,84	En cours
			M	1 055,3	7°37	124,3	7°25	14°63	3,10	0,22	3,87	En cours

2° chaque cépage, placé dans des conditions de vinification par macérat carbonique, va réagir à ces contraintes selon des règles personnelles.

2. *Le tableau 2 donne les analyses sommaires* des différents moûts obtenus au p surage.

Des anomalies apparaissent dans les teneurs en alcool acquis des moûts ; a l'alcool acquis du « moût d'assemblage » peut être inférieur à celui du moût de go et à celui du moût de presse correspondants. Ceci est dû au fait que les échantill tout en étant stabilisés par de l'anhydride sulfureux lors du pressurage, sont repa en fermentation, dans certains cas, au moment de l'analyse.

Compte tenu de ces restrictions, quelques résultats peuvent être retenus :

Les moûts de goutte ont des teneurs en alcool très supérieures (2° à 6°) à celles moûts de presse correspondants ; les quantités de sucres contenues dans les prem sont plus faibles (60 à 180 g/l) que celles mesurées dans les seconds. (Les jus de go et de presse de vendange foulée (n° 9) présentent des valeurs « d'alcool-sucres » se blement identiques.)

Le degré alcoolique acquis des mélanges de moût semble augmenter avec la t

Composition analyti

Les analyses ont été effectuées en décembre 1967 pour les

Année	N° cuve	Densité à 15°C	Degré alcool acquis	Sucres g/l	Aldéhyde mg/l	Glycérol g/l	AT g/l	AV g/l	PH
1967	1	991,5	14°80	1,84	28,1	8,924	2,40	0,16	4,00
	2	992,2	14°70	2,16	31,6	9,015	2,20	0,20	4,07
	3	989,8	15°20	1,77	22,8	7,820	2,50	0,20	3,92
	4	991,4	14°60	1,84	21,1	7,728	2,20	0,19	3,95
	5	989,5	15°40	1,69	12,3	8,556	2,60	0,20	3,88
	6	989,5	15°40	1,71	14,0	7,268	2,20	0,18	3,98
1968	7	991,5	15°20	2,50	14,0	8,280	2,80	0,50	3,88
	8	993,1	13°90	2,03	15,8	7,820	2,80	0,30	3,90
	9	993,4	15°10	2,66	12,3	9,930	3,20	0,32	3,80
	10	991,1	15°20	2,07	12,3	8,920	2,90	0,45	3,82
	11	990,5	15°40	1,62	12,3	8,550	2,40	0,28	3,90
	12	991,5	14°70	1,52	18,4	8,180	2,50	0,38	3,90

pérature et la durée de macération alors que, parallèlement, la quantité de sucres résiduaires diminue.

En macération carbonique, le degré alcoolique total du jus de goutte est toujours nettement inférieur à celui du jus de presse (alors qu'il s'en écarte peu dans le cas de la vendange foulée). Deux phénomènes, inhérents à la vinification « Vendange entière » peuvent expliquer ces différences :

1° le jus de goutte a subi des fermentations microbiennes productrices, dans le milieu, de quantités importantes d'éthanol ; ces quantités sont supérieures à celles émises par la fermentation intracellulaire à l'intérieur des baies. Des diffusions, tant en milieu liquide (vendange baignant dans le moût) qu'en phase gazeuse (atmosphère de la cuve saturée de vapeurs d'alcool), ont lieu du milieu externe (moût) au milieu interne (baies) (travaux en cours).

2° le moût s'appauvrissant en sucres réducteurs plus rapidement que les baies, les glucides contenus dans ces dernières ont tendance à diffuser vers le milieu extérieur (moût). Il est possible que cette diffusion n'obéisse pas aux mêmes lois que celles régissant la diffusion de l'éthanol (travaux en cours). Ainsi, la vitesse de sortie des

renache noir

nvier 1969 pour les vins de 1968

PH	Alcalinité Cendres	méq/l K	méq/l Na	méq/l Ca	méq/l Mg	Acide tartrique	méq/l Cl	méq/l Fe	méq/l Cu	mg/l N
,00	38	46,6	0,9	3,65		28				
,07	37	47,6	0,9	3,4		24				
,92	33	42	0,9	3,35		24				
,95	36	46,1	0,8	3,9		26,5				
,88	29,5	37,4	0,9	3,75		44				
,98	33	41,5	0,9	3,45		25				
,88	29	33,8	1,13	3,6	8,3	25	1,4	4	0,57	336
,90	31,5	35,3	1,04	3,3	13	28	1,4	4,7	0,26	546
,80	34	35,8	0,86	3,8	8,48	26	1,4	4,6	0,48	399
,82	32	33,8	1,04	3,5	7,9	26	1,5	3,5	0,20	339,5
,90	29	31,8	0,86	3,2	8,3	24	1,4	6,5	0,43	350
,90	31	33,5	1,13	3,6	8,3	24	1,6	5,8	0,36	476

sucres des baies vers le moût serait moins élevée que la vitesse d'entrée de l'alc dans les baies. Ces deux phénomènes conjugués conduisent bien à une augmentat du degré alcoolique total des moûts de presse par rapport au degré correspond des moûts de goutte.

Vraisemblablement, les différences observées entre les teneurs en alcool to dans les deux essais, proviennent davantage de fluctuations individuelles des éch tillons plutôt que de l'influence de la température et de la durée de cuvaison.

Les acidités totales sont très proches pour les différents mélanges de moûts d'u année donnée ; il en est de même pour les acidités volatiles. Ces deux fonctions en moyenne des valeurs plus fortes en 1968 qu'en 1967. Par ailleurs, il semble que fermentation malolactique ait plus de difficultés à se déclencher en 1968.

La composition analytique des vins est rapportée dans le tableau 3 et 3 bis.

Des différences sont parfois enregistrées entre le degré alcoolique total calc au pressurage et le degré alcoolique final des vins ($\pm$ 0°50).

En 1968, des pertes importantes d'alcool ont eu lieu, après le pressurage, d le lot n° 8 fermentant à haute température (35°C).

Dans tous les vins ayant subi une macération carbonique, les doses de suc résiduaires sont très faibles, moins de 2,5 grammes par litre.

En 1967, la teneur en acétaldéhyde croît avec la température et la durée de ma ration. En 1968, elle croît aussi avec la durée mais moins nettement du fait de température élevée de la deuxième fermentation pour les échantillons 7 et 8. dosage du glycérol ne fait pas apparaître de différences significatives entre les vi

Les acidités volatiles, faibles dans tous les cas pour des vins aussi riches en ét nol, sont plus basses en 1967 qu'en 1968. Cela est vraisemblablement dû à l'élévati en 1968 de la température de la fermentation finale qui est conduite dans des cu en vidange (2/3 du volume) sans addition de SO_2 pour les vins de macération car nique.

Les valeurs de l'extrait sec, des cendres et du potassium croissent avec la te pérature et la durée de macération. L'alcalinité des cendres augmente avec la tem rature et parfois la durée de cuvaison.

Les résultats concernant les matières polyphénoliques des vins (tabl. 4) *montr que :*

— les valeurs des indices relatives aux vins de 1967 sont fréquemment différen de celles obtenues en 1968. De plus, les variations observées entre les vins de 1 sont parfois moins importantes que celles enregistrées pour les vins de 1967. Tou fois, en 1968, la température de la deuxième fermentation peut introduire un fact de perturbation (cas du n° 7). Au cours de cet essai, la vinification par vendan foulée a permis d'extraire davantage de matières colorantes et « tannoïdes ».

— l'intensité colorante croît avec la température. Pour cet indice, l'influence d durée de cuvaison est surtout sensible à 25°C ; ceci implique qu'un seuil d'extracti est rapidement atteint à 35°C et que, d'autre part, la diffusion des polyphénols con dérés reste faible à 15°C pour la durée des expériences.

— sous l'influence de la température et de la durée de cuvaison, les chromopho rouges (D. O. : 520 nm) et jaunes (D. O. 420 nm) évoluent parallèlement à l'int sité colorante globale (D. O. 520 nm + D. O. 420 nm).

— la teinte rouge, exprimée par le rapport $\frac{\text{D. O. 520}}{\text{D. O. 420}}$, varie peu entre tous

— *Conditions expérimentales*

Les mesures de composés polyphénoliques ont été réalisées respectivement en décembre 1967 (vins de 1967) et en janvier 1969 (vins de 1968).
Les dégustations ont eu lieu en avril 1968 (vins de 1967) et le 27 juin 1969 (vins de 1968).

— *Expression des résultats*

Les D. O. à 520 et 420 nm sont obtenues en cuve de 1 mm sur du vin non dilué.
Les D. O. à 280 nm sont obtenues en cuve de 1 cm sur du vin dilué au 1/100e avec de l'éthanol 50°.
L'intensité de coloration (I) correspond à l'indice défini par SUDRAUD (1958).

La teinte $\left(\frac{\text{D. O. 520}}{\text{D. O. 420}}\right)$ traduit la tendance de la couleur du vin vers le rouge.

$\alpha \div \left[\text{tg } \alpha = \left(\frac{\text{D. O. 520} - \text{D. O. 420}}{100}\right)\right]$ est l'indice défini par DIMOTAKI-KOURAKOU et HARVALIA (1966).

L'indice obtenu par le rapport $\frac{\text{D. O. 520}}{\text{D. O. 280}}$ peut permettre d'évaluer « l'équilibre de composition du vin ».

Les notes de dégustation représentent les moyennes (sur 20) des notes attribuées par un jury de 3 dégustateurs en 1967 et de 5 dégustateurs en 1968.

Année	1967						1968					
N° cuve	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D.O. 520	0,495	0,542	0,232	0,460	0,110	0,185	0,340	0,437	0,475	0,332	0,190	0,262
D.O. 420	0,428	0,470	0,230	0,390	0,120	0,185	0,360	0,413	0,432	0,352	0,200	0,260
D.O. 280	0,588	0,657	0,376	0,592	0,263	0,388	0,928	1,130	1,130	0,870	0,543	0,740
I = D.O. 520 + D.O.420.	0,923	1,012	0,462	0,850	0,230	0,370	0,700	0,850	0,907	0,684	0,390	0,522
$T = \frac{\text{D.O. 520}}{\text{D.O. 420}}$	1,156	1,153	1,009	1,180	0,916	1,000	0,944	1,058	1,099	0,943	0,950	1,007
α	33°8	35°8	1°2	35°	— 5°7	0°	— 11°4	13°5	23°3	— 11°4	— 5°8	1°2
$\frac{\text{D.O. 520}}{\text{D.O. 280}}$	0,847	0,825	0,617	0,777	0,418	0,477	0,370	0,386	0,425	0,382	0,350	0,354
Dégustation	16,2	15,6	14,5	15,6	12,8	13,6	12,9	11,7	12,0	—	11,3	9,6

vins des deux années d'essais. Température et durée de macération influent peu
le rapport d'extraction $\frac{\text{chromophores rouges}}{\text{chromophores jaunes}}$; cette teinte traduirait une certa
constante du cépage pour des conditions de vinification données (POUX, AUBERT, 196

— les polyphénols totaux (D. O. 280 nm) augmentent beaucoup lorsque la tem
rature s'élève de 25 à 35°C pour de courtes cuvaisons. En revanche, pour de long
cuvaisons, cette augmentation est surtout importante entre 15 et 25°C.

— l'indice d' « équilibre de composition » $\frac{\text{D. O. 520}}{\text{D. O. 280}}$ (AUBERT, POUX, 1969) s'él
avec la température. Le classement établi sur ce rapport est en bonne corrélati
avec celui donné par les dégustations. Les vins élaborés à 35° sont les mieux notés.

— les valeurs du rapport $\frac{\text{D. O. 520}}{\text{D. O. 280}}$ diffèrent peu pour les vins d'une même an
entre 25 et 35°C. Cet « équilibre de composition » varie davantage d'une anné
l'autre et caractérise une vendange (AUBERT, POUX, 1969).

La figure 1 schématise l'évolution des chromophores rouges et des tannoïdes so
l'influence des deux facteurs étudiés en 1967.

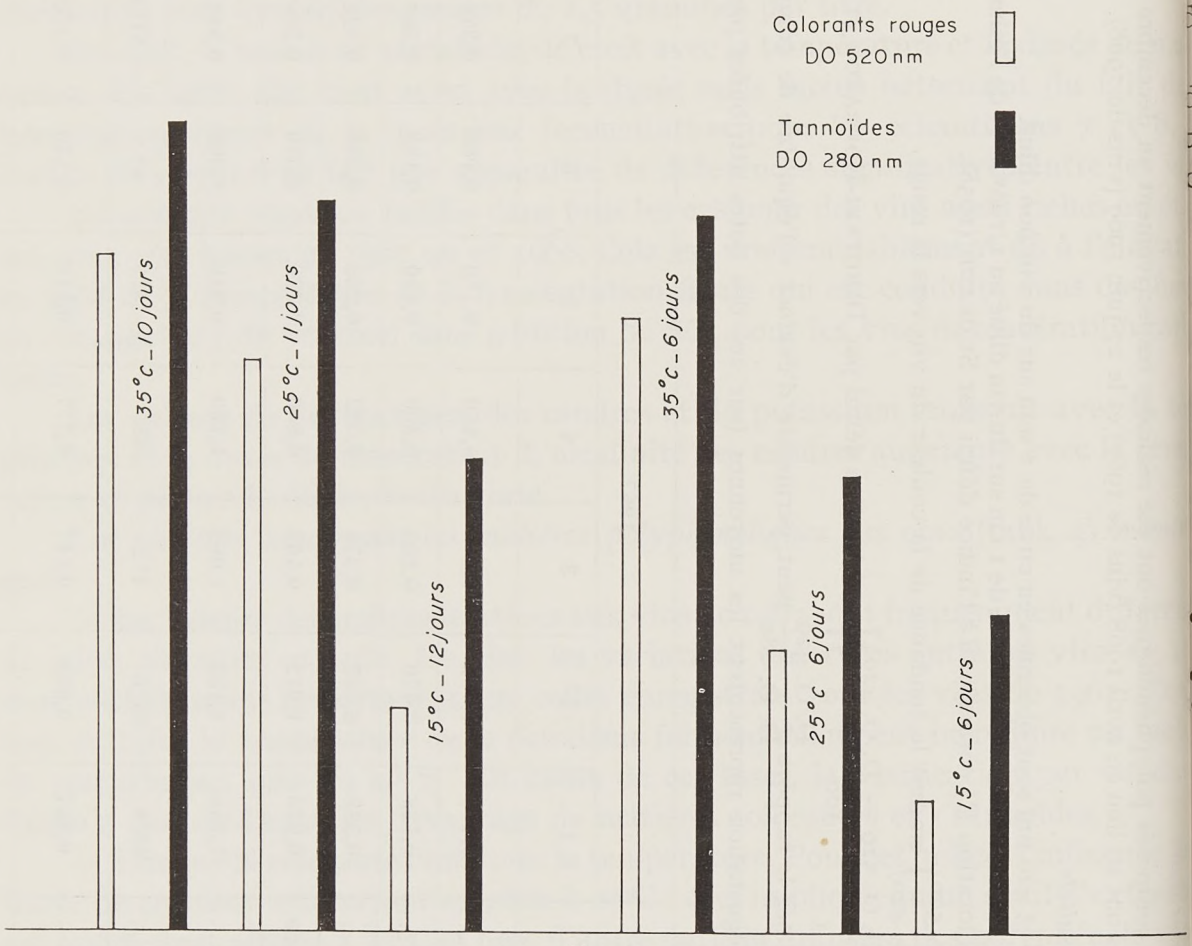


FIG. 1.

CONCLUSION

*Une élévation de la température et une augmentation de la durée de macération ca
bonique* augmentent l'extrait sec, la coloration et la teneur en acétaldéhyde des vin

D'autre part, les vins élaborés à haute température sont plus appréciés que ceux obtenus à 15°C.

Des règles pratiques, concernant la conduite de vinifications par macération carbonique de vins secs de *Grenache noir*, peuvent être proposées :

1° les vins macérés à haute température (35-25°C) sont les mieux classés au cours des dégustations ; une cuvaison courte (6-8 jours) est toutefois souhaitable pour une macération à 35°C ;

2° des températures modérées (15-20°C) au cours de la fermentation finale, après pressurage, paraissent bénéfiques pour la bonne qualité des vins ;

3° pour accroître l'intensité de la couleur du vin (D. O. 520 + D. O. 420), il est préférable d'augmenter la température de macération plutôt que sa durée, celle-ci n'intervenant de façon sensible qu'à 25°C ;

4° l'élévation de la quantité de polyphénols totaux est obtenue indifféremment par augmentation de la température ou de la durée de cuvaison (sauf pour les vins élaborés à 35°C qui voient leur teneur en polyphénols atteindre rapidement un palier).

En résumé, l'élaboration de vins secs de *Grenache rouge*, type *Hautes Corbières*, peut se réaliser avantageusement par une macération à 30-35°C durant une huitaine de jours, suivie, après pressurage, d'une fermentation secondaire conduite à 15-20°C.

Ces essais montrent, à leur tour, l'importance du facteur température, au cours des différents stades de fermentation, sur les caractéristiques gustatives et analytiques des vins finis. Cette importance doit inciter les producteurs à équiper leurs caves en moyens de régulation thermique.

Reçu pour publication en décembre 1969.

SUMMARY

VINIFICATION BY THE CO_2 MACERATION METHOD.

IV. — THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND LENGTH OF CO_2 MACERATION ON THE QUALITY OF DRY WINES MADE FROM « BLACK GRENACHE » GRAPES

The respective influence of temperature and the length of CO_2 maceration on the quality of dry wines from *Black Grenache* were studied during the grape harvests of 1967 and 1968.

Practical proposals for making this type of wine are put forward. Thus it is advisable to conduct the CO_2 maceration at 30-35°C for about a week, followed, after pressing, by a secondary fermentation at 15-20°C.

RESUMEN

MÉTODO DE VINIFICACIÓN POR MACERACIÓN CARBÓNICA.

IV. — INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y DE LA DURACIÓN DE LA MACERACIÓN CARBÓNICA SOBRE LA CALIDAD DE LOS VINOS SECOS ELABORADOS POR MEDIO DE « GARNACHA NEGRA »

Las influencias respectivas de la temperatura y de la duración de maceración carbónica sobre la calidad de los vinos secos de *Garnacha negra* han sido sometidas a estudio durante las vendimias de 1967 y 1968.

Se proponen reglas prácticas para la elaboración de este tipo de vino y se aconseja efect una maceración carbónica a 30-35°C durante unos ochos días, seguida, después del prensado, une fermentación secundaria a 15-20°C.

RIASSUNTO

METODO DI VINIFICAZIONE MEDIANTE MACERAZIONE CARBONICA.

IV. — INFLUENZA DELLA TEMPERATURA E DELLA DURATA DI MACERAZIONE CARBONI SULLA QUALITA DEI VINI SECCHI ELABORATI DA « GRENACHE NERA »

Le influenze rispettivamente della temperatura e della durata di macerazione carbon sulla qualità dei vini secchi di *Grenache nera*, sono state studiate durante le vendemmie del 1 e 1968.

Per l'elaborazione di questo tipo di vino sono state proposte delle regole pratiche. Si p consigliare così di realizzare una macerazione carbonica a 30/35°C per otto giorni circa, facend seguire, dopo torchiatura, da una fermentazione secondaria a 15/20°C.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Bénard P., Chambroy Y., Flanzy C., Jouret C., 1967. Méthode de vinification Macération Carbonique. I. Production de Jus de Goutte en vinification par Macération Carboniq *Ann. Technol. agric.*, **16**, 109-116.

Aubert S., Poux C., 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. I. Technique d'estimati d'une vendange. II. Taux de passage dans les vins. *Ann. Technol. agric.* **18** (2), 93-109 ; 111-127.

Dimotaki-Kourakou V. Mme, Harvalia A., 1966. Contribution à l'expression des caractéristiq chromatiques du vin. *Off. internation. Vigne Vin, Méthodes analytiques*, **206**, 11, rue Roquépine, Paris

Flanzy M., 1935. Sur la vinification des vins rouges. Nouvelle méthode de vinification. *Rev. Vit.*, 8 315-319 ; 323-329 ; 339-347. *C. R. Acad. Agric.*, **21**, 935-938.

Poux C., Aubert S., 1968. Corrélations entre la constitution en composés phénoliques des vins, température de vinification et les caractéristiques générales de l'année. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 299-31

Sudraud P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. agric.*, 203-208.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (1), 41-51.

SUR LA DÉGRADATION THERMIQUE DE LA PROTOPECTINE DES FRUITS A NOYAU. APPLICATION A LA PRÉVISION D'UNE DÉGRADATION DONNÉE LORS DES OPÉRATIONS D'APPERTISATION

M. SOUTY et A. PERRET (1)

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, 84 - Montfavet
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Poursuivant leurs travaux concernant l'étude des phénomènes liés à l'évolution de la protopectine des fruits, les auteurs ont déterminé, pour deux variétés d'abricots et trois variétés de pêches, la valeur du coefficient ζ représentant l'élévation de température nécessaire pour abaisser au dixième de sa valeur le temps θ au bout duquel le pourcentage initial de protopectine est réduit au dixième de sa valeur. La connaissance de ce facteur ζ permet de prévoir, pour une température donnée, la valeur du temps de chauffage requis pour l'obtention d'un pourcentage fixé de dégradation de la protopectine.

INTRODUCTION

Les travaux précédemment réalisés au laboratoire ont montré le rôle prépondérant des substances pectiques, principalement de la protopectine, dans la « tenue » des oreillons appertisés au sirop des fruits tels que les abricots (Souty *et al.*, 1969) et les pêches (Souty, Poggi, Breuils, 1967).

Nous avons vu que cette « tenue » dépendait de la dégradation de la protopectine au cours des différents traitements intervenant lors du processus de fabrication, mais cette dégradation dépend d'un certain nombre de facteurs :

— nature de la protopectine,

(1) Stagiaire E. N. S. I. A.

— nature de la composition chimique du fruit (principalement état de maturité)
— durée et température de stérilisation.

S'il est difficile d'intervenir sur les deux premiers facteurs, puisqu'ils caractérisent la nature même des fruits, par contre il semble intéressant de chercher l'éventuelle possibilité de contrôler la dégradation des protopectines des fruits d'une variété donnée, en agissant sur les deux facteurs temps et température.

En s'inspirant de la destruction des microorganismes lors des opérations de pasteurisation ou de stérilisation (M. LONCIN, 1961) nous avons essayé de voir si on pouvait appliquer à la dégradation de la protopectine, comme cela a déjà été fait pour un certain nombre d'autres transformations, la relation établie pour la diminution d'une population donnée de microorganismes :

$$\log \frac{\theta_{t_1}}{\theta_{t_2}} = \frac{t_2 - t_1}{\zeta} \quad (1)$$

Lorsqu'une suspension de microorganismes est portée à une température dite létale, une diminution de cette population en fonction du temps est constatée. D'une façon générale, dans un milieu donné, toute élévation de température permet de diminuer le temps nécessaire à la destruction de cette population. D'une manière plus précise, le temps θ nécessaire pour réduire au dixième une population est une fonction de la température t considérée. L'expérience montre que cette fonction s'exprime d'une façon très satisfaisante et entre de larges limites par la relation (1) précédemment indiquée. θ_{t_1} et θ_{t_2} sont les valeurs de θ respectivement aux températures t_1 et t_2.

ζ représente l'élévation de température nécessaire pour réduire au dixième la valeur de θ, ou encore l'élévation de température permettant de réduire au dixième le temps nécessaire à la destruction partielle ou totale d'une population.

La connaissance du facteur ζ, caractéristique d'une variété donnée, permettra d'établir la relation temps-température pour une dégradation fixée de protopectine. Nous pourrons donc fixer la température et la durée de stérilisation nécessaires pour obtenir un pourcentage connu de dégradation de la protopectine d'une variété donnée.

En effet, si pour détruire un pourcentage donné de protopectines à une certaine température $t_{\text{réf.}}$ un temps $\theta_{\text{réf.}}$ secondes est requis, pour détruire ce même pourcentage de protopectines à une température t, la valeur du temps θ_t sera telle que :

$$\log \frac{\theta_t}{\theta_{ref}} = \frac{t_{\text{réf.}} - t}{\zeta}$$

$$\text{soit : } \log \theta_t = \log \theta_{\text{réf.}} + \frac{t_{\text{réf.}} - t}{\zeta}$$

$$\theta_t = 10^{\log \theta_{\text{ref}} + \frac{t_{\text{ref}}}{\zeta} - \frac{t}{\zeta}} \quad (2)$$

Pour calculer ce temps θ_t à partir de la relation (2) il est donc indispensable de connaître ζ.

D'après les travaux cités par LONCIN, l'élévation de température ζ permettant

de ramener au dixième le temps nécessaire à une transformation donnée a pour valeur :

— 10°C pour la destruction des spores de *Clostridium* et *Bacillus* ;

— 5°C pour la destruction des formes végétatives ;

— entre 5 et 40°C pour l'inactivation des enzymes ;

— entre 20 et 35°C pour les réactions de détérioration de goût, de couleur, de texture, se produisant par traitement thermique, ou encore pour la destruction de certains constituants chimiques.

La détermination de ζ lors de la dégradation de deux variétés d'abricots et de trois variétés de pêches fait l'objet du présent travail ; de plus, nous mettons en lumière la possiblité d'atteindre à partir de la valeur de ζ le temps nécessaire pour la dégradation d'un certain pourcentage de protopectine à une température donnée.

MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

Nous avons vu que pour détruire $100\,\frac{P}{Po}$ de protopectines, il faut un temps θ_1 s à une température t_1 °C et que pour détruire le même pourcentage de protopectines à t_2 °C il faudra un temps θ_2 s ; d'après la relation (1) nous déduisons :

$$\zeta = \frac{t_2 - t_1}{\log \theta_1 - \log \theta_2} \qquad (3)$$

Pour connaître la valeur de ζ il faut donc déterminer deux temps : θ_1 et θ_2 expérimentalement.

Dans ce but, nous avons hydrolysé les substances pectiques de ces fruits à deux températures déterminées et pendant des temps bien établis.

La méthode de travail a été sensiblement la même dans le cas des abricots et des pêches.

Les fruits provenaient du verger expérimental de la Station de Recherches d'Arboriculture fruitière de la Grande-Ferrade à Manduel (Gard).

Les variétés d'abricots ont été : *Canino* et *Muscat de Provence* récoltés à bonne maturité commerciale.

Les variétés de pêches ont été : une pêche à noyau libre *Fairhaven*, et deux pavies : *Shasta* et *Babygold 6*. La première, récoltée assez ferme, avait atteint une maturité normale à la température du laboratoire ; *Shasta* a été étudiée à un stade vert, contrairement à *Babygold 6* prise à un état bien mûr.

Après broyage des fruits dans un mixer, la purée a été répartie à raison de 10 g par erlen, dans deux séries d'erlens : la série 1 a été hydrolysée dans un bain-marie à 89°5 ± 0°5C, la série 2 à 114°5 ± 0°5C. Dans le cas des pêches, dans tous les erlens, nous avons ajouté à la purée 10 ml d'eau pour éviter la dessiccation des échantillons lors de l'hydrolyse. Pour chaque série nous avons procédé à dix durées différentes d'hydrolyse, de 0 à 40 minutes ; pour la série 2, les durées les plus longues ont conduit à un dessèchement de l'échantillon dans le cas des abricots.

A leur sortie du bain-marie, les erlens ont été rapidement refroidis dans la glace ; ensuite, nous avons successivement extrait :

— la pectine soluble par une solution d'oxalate d'ammonium à 1 p. 100 (de façon à extraire la pectine soluble et le pectate),

— la protopectine par HCl 0,05 N, à chaud.

Chacune de ces fractions a été dosée selon la méthode au Carbazole de Dishe, méthode déjà utilisée plusieurs fois au laboratoire.

RÉSULTATS

A. — *Cas des deux variétés d'abricots*

1. *Résultats expérimentaux.*

Les résultats expérimentaux sont rapportés dans la figure 1 sur laquelle nous avons fait apparaître que les résultats des dosages de la dégradation de la pr

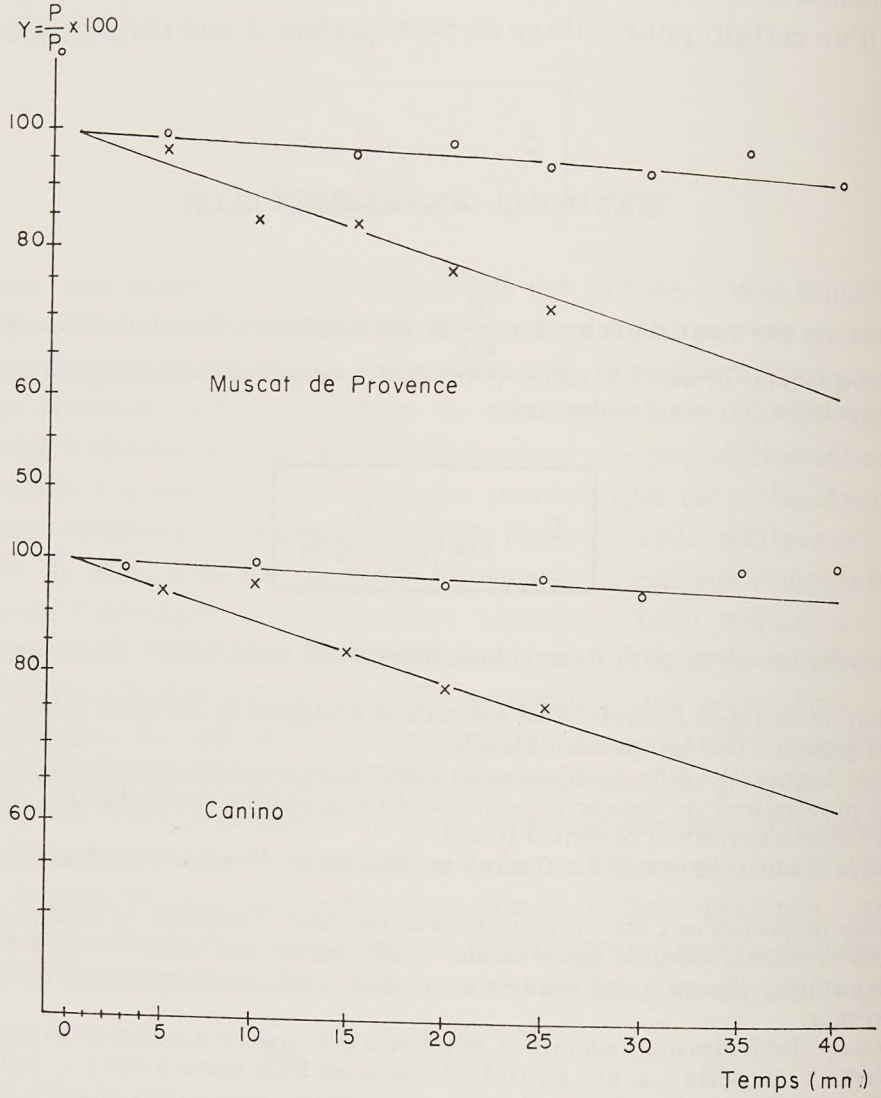


FIG. 1. — *Dégradation de la protopectine des deux variétés d'abricots à 89° 5C (—○—) et à 114° 5C (—×—)*

pectine. En ordonnée (échelle logarithmique) nous avons porté le rapp

$$Y = \frac{P_0}{P} \times 100$$

qui représente le pourcentage de protopectines non hydrolysées rapport à l'échantillon initial, et en abscisse le temps.

Nous avons obtenu dans tous les cas sensiblement des droites malgré la prése de certains points aberrants dus, pour la dégradation à 89° 5C aux difficultés dosage, alors que la dégradation est très faible, et pour la dégradation à 114° 5C dessèchement signalé de l'échantillon.

Pour les deux variétés, nous constatons que la dégradation est beaucoup plus rapide à 114,5°C qu'à 89,5°C. L'allure du phénomène est identique pour les deux variétés étudiées dans le présent travail.

2. *Détermination de* ζ.

A partir des deux droites précédentes, deux modes de calculs sont possibles.

a) *Méthode graphique.*

Une destruction donnée est représentée par une horizontale. Les couples de valeurs $(\theta_1 ; t_1)$, $(\theta_2 ; t_2)$ sont déterminés par les coordonnées des points d'intersection de l'horizontale considérée avec les deux droites de dégradation. Cependant, les pentes des droites étant très faibles en valeur absolue, la localisation exacte des points d'intersection peut être entachée d'une erreur importante ; celle-ci vient s'ajouter aux erreurs de manipulation déjà signalées.

Dans le cas de la variété *Muscat de Provence* nous avons pu fixer quatre déterminations de couples. Tous les calculs sont rapportés dans le tableau I et nous obtenons : $\zeta = 32°C$.

TABLEAU I

Détermination graphique de ζ *dans le cas de la variété* Muscat de Provence

$Y = \frac{100\ P}{P_0}$	92	94	96	98
θ_1 mn	40	27,5	17,5	7,5
θ_1 s	2 400	1 650	1 050	450
θ_2 mn	6,25	4,75	3	1,25
θ_2 s	375	285	180	75
$t_2 - t_1$	25	25	25	25
log θ_1	3,380 21	3,217 48	3,021 19	2,653 21
log θ_2	2,574 03	2,454 84	2,255 27	1,875 06
log θ_1 — log θ_2	0,806 18	0,762 64	0,765 92	0,778 15
$\zeta = \frac{t_2 - t_1}{\log \theta_1 - \log \theta_2}$	31	32,8	32,6	32,1

Nous prendrons $\zeta = 32$.

b) *Méthode analytique.*

A partir des résultats expérimentaux nous pouvons calculer les équations des droites de dégradation.

Celles-ci s'écrivent :

Muscat de Provence	*Canino*
$\theta_1 = 66\,243 \cdot \log \frac{100}{Y}$	$\theta_1 = 89\,087 \cdot \log \frac{100}{Y}$
$\theta_2 = 10\,814 \cdot \log \frac{100}{Y}$	$\theta_2 = 11\,559 \cdot \log \frac{100}{Y}$

A partir de ces équations, la relation (3) donne :

Muscat de Provence : $\zeta = 32^{\circ}C$
Canino : $\zeta = 28^{\circ}C$

Les méthodes graphique et analytique conduisent au même résultat, mais la précision est certainement moins bonne avec la méthode graphique qu'avec la méthode analytique. Les valeurs de ζ pour les deux variétés sont assez peu différentes.

3. *Détermination des relations temps-température*

Pour le cas particulier de ces deux variétés d'abricots, à la température de référence $t_{réf.} = 114^{\circ}5C$ nous calculons (pour une destruction de 10 p. 100 de protopectine) :

Muscat de Provence	*Canino*
$\theta_{ref.} = 494$ s	$\theta_{ref.} = 528$ s

d'où, d'après la relation (2), les équations :

Muscat de Provence : $\theta_t = 10^{6,27 - \frac{t}{32}}$
Canino : $\theta_t = 10^{6,81 - \frac{t}{28}}$

Ces relations sont importantes car elles permettent de déterminer le temps nécessaire pour détruire 10 p. 100 de protopectine (par exemple) à une température t donnée.

Par exemple, à 100°C et à 110°C les valeurs de θ sont respectivement :

Muscat de Provence	*Canino*
$\theta_{100} = 1\,380$ s = 23 mn	$\theta_{100} = 1\,780$ s = 29 mn 40 s
$\theta_{110} = 676$ s = 11 mn 16 s	$\theta_{110} = 758$ s = 12 mn 38 s

B. — *Cas des trois variétés de pêches*

1. *Résultats expérimentaux*

Les résultats sont portés sur la figure 2 (temps en abscisse, pourcentage de proto-

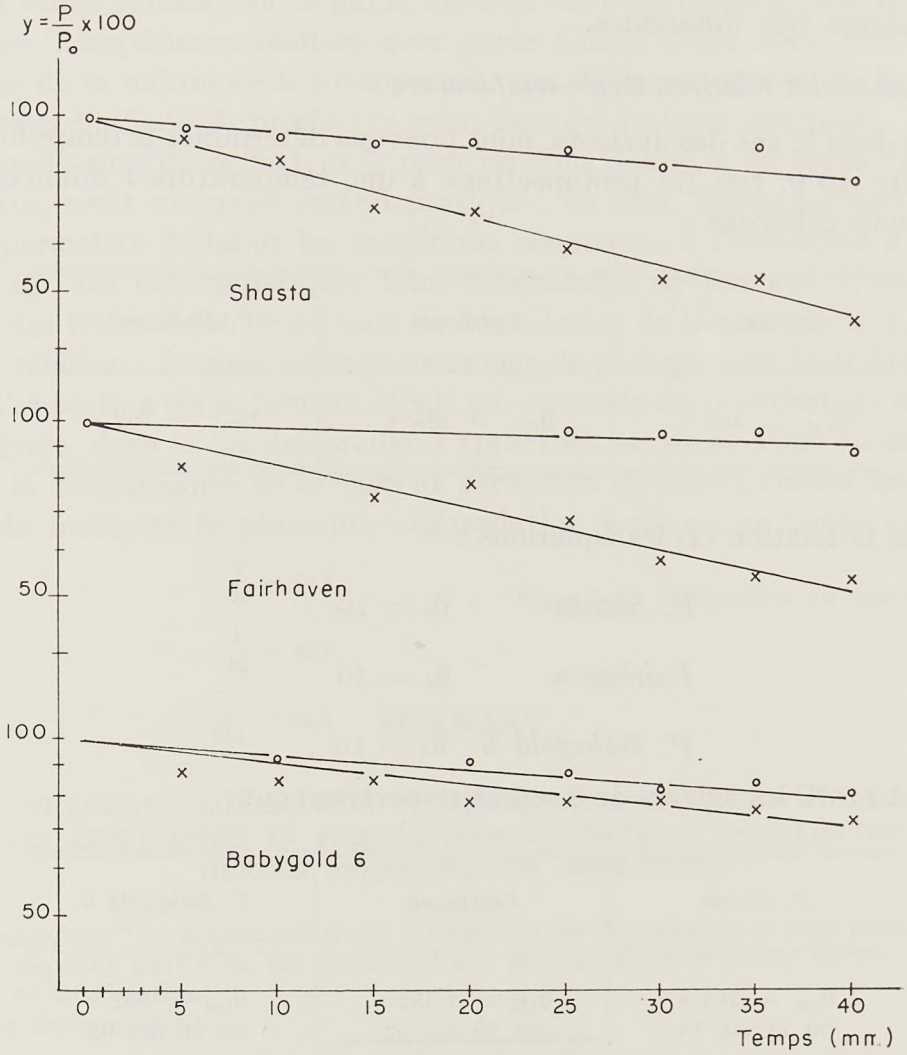


FIG. 2. — *Dégradation de la protopectine des trois variétés de pêches à 89 5°C (—○—) et à 114° 5C (—×—)*

pectine non hydrolysée en ordonnée). Nous avons obtenu des droites dans tous les cas et observons de nettes différences selon les variétés.

2. *Détermination de* ζ.

Nous employons uniquement la méthode analytique.

Les équations sont :

P. Shasta	*Fairhaven*	*P. Babygold 6*
$\theta_1 = 26\,307 \log \cdot \frac{100}{Y}$	$\theta_1 = 89\,086 \cdot \log \frac{100}{Y}$	$\theta_1 = 24\,765 \cdot \log \frac{100}{Y}$
$\theta_2 = 7\,318 \log \cdot \frac{100}{Y}$	$\theta_2 = 8\,451 \cdot \log \frac{100}{Y}$	$\theta_2 = 16\,819 \cdot \log \frac{100}{Y}$

et la relation (3) conduit à :

P. Shasta : $\zeta = 45^{\circ}C$
Fairhaven : $\zeta = 24^{\circ}C$
P. Babygold 6 : $\zeta = 149^{\circ}C$

soit trois valeurs très différentes.

3. *Détermination des relations temps-température*

Comme dans le cas des abricots, nous pouvons déterminer le temps θ_t nécessaire pour détruire 10 p. 100 de protopectines à une température t donnée. Pour $= 114^{\circ}5C$ nous calculons :

P. Shasta	*Fairhaven*	*P. Babygold 6*
$\theta_{ref.} = 335$ s	$\theta_{ref.} = 386$ s	$\theta_{ref.} = 769$ s

d'où, d'après la relation (2) les équations :

$$P.\ Shasta : \theta_t = 10^{5,07 - \frac{t}{45}}$$

$$Fairhaven : \theta_t = 10^{7,36 - \frac{t}{24}}$$

$$P.\ Babygold\ 6 : \theta_t = 10^{3,65 - \frac{t}{149}}$$

A 100 et 110°C les valeurs de θ seront respectivement :

P. Shasta	*Fairhaven*	*P. Babygold 6*
$\theta_{100} = 704$ s ou 11 mn 44	$\theta_{100} = 1\,552$ s ou 25 mn 52	$\theta_{100} = 962$ s ou 16 mn 02
$\theta_{110} = 422$ s ou 7 mn 02	$\theta_{110} = 594$ s ou 9 mn 54	$\theta_{110} = 824$ s ou 13 mn 44

CONCLUSION

Nous constatons des résultats très différents selon le fruit considéré : pêches abricots.

La dégradation des protopectines semble être sensiblement la même pour deux variétés d'abricots étudiées : néanmoins, des valeurs de ζ un peu différen peuvent laisser supposer qu'une même élévation de température aura un effet peu plus marqué sur *Canino* que sur *Muscat de Provence* : en effet, comme le montr les calculs de θ_{100} et de θ_{110}, la variation relative du temps θ, pour une même variati de 10°C en température, est plus importante pour la variété *Canino* que pour variété *Muscat de Provence*.

Dans le cas des pêches, les résultats obtenus confirment les comportements différents de la pavie et de la pêche vis-à-vis de l'appertisation. A état de maturité semblable, les protopectines de la pêche (*Fairhaven*) et de la pavie (*Babygold 6*) ne sont pas dégradées de façon identique ; il semblerait qu'une élévation de température n'ait qu'une faible influence sur la pavie, alors qu'elle a des conséquences très marquées sur la pêche. L'expérience réalisée avec pavie *Shasta* (fruit vert) met en lumière l'importance de la nature de la protopectine aux différents stades de la maturité ; nous essaierons d'ailleurs de préciser ce point dans des travaux ultérieurs.

La connaissance de ce facteur ζ, pour un fruit donné, à un stade déterminé de son évolution, revêt un grand intérêt pratique : en effet, théoriquement, ce facteur peut nous permettre d'établir les conditions nécessaires à l'obtention d'un produit fini possédant des caractéristiques bien déterminées de fermeté. L'amollissement de la chair des fruits étant lié au taux de dégradation de la protopectine, l'établissement de la relation : fermeté selon pourcentage de protopectine hydrolysée pourrait aboutir à l'obtention de la fermeté idéale par contrôle du pourcentage de protopectine hydrolysée, dans le cas des oreillons appertisés au sirop. Pour l'élaboration des confitures, la connaissance de ce facteur permettra de mieux choisir les variétés et leur état de maturité le plus apte : dégradation facile en un temps suffisamment court.

Reçu pour publication en janvier 1970.

SUMMARY

THERMAL DEGRADATION OF PROTOPECTIN IN STONE FRUIT. ITS APPLICATION IN FORECASTING A SPECIFIED DEGRADATION DURING APPERTISATION OPERATIONS

The " behaviour " of appertised fruits is linked to the degradation of their protopectins. This degradation depends partly on the nature of the protopectin and partly on the duration and temperature of sterilization.

By using the equation :

$$\log \frac{\theta t_1}{\theta t_2} = \frac{t_2 - t_1}{\zeta} \qquad (1)$$

established by M. Loncin (1961) in the destruction of micro-organisms, it is possible to calculate ζ in the degradation of protopectin in fruit.

In the current experiment this factor was determined for two apricots (*Muscat of Provence* and *Canino* varieties) three peaches (one free stone : *Fairhaven* variety), and two clingstone peaches : (*Shasta* and *Babygold 6* varieties) by studying experimentally the degradation of these fruits at two different temperatures.

Knowledge of this factor allows prediction of the duration of sterilization which, at a given temperature will, cause a given percentage degradation of the protopectin, if the time needed to obtain this same deterioration at another temperature is known. Thus from equation (1)we proceed to :

$$\theta_t = 10^{\log \theta_{ref} + \frac{t_{ref}}{\zeta} - \frac{t}{\zeta}} \qquad (2)$$

The values obtained for ζ are :

Muscat of Provence	$\zeta = 32^{\circ}C$
Canino	$\zeta = 28^{\circ}C$
P. Shasta.....	$\zeta = 45^{\circ}C$
Fairhaven	$\zeta = 24^{\circ}C$
P. Babygold 6	$\zeta = 149^{\circ}C$

The degradation of protopectins is substantially identical for the two varieties of apric studied, but *Canino* is more sensitive to a rise in temperature than *Muscat of Provence.*

For peaches, the results confirm the very different behaviour of the free-stone peach an the cling-stone peach during appertisation, and they also emphasize the importance of the pr perties of the protopecting according to its degree of maturity.

RESUMEN

SOBRE LA DEGRADACIÓN TERMICA DE LAS PROTOPECTINAS DE LAS FRUTAS A CAROZO. APLICACIÓN A LA PREVISIÓN DE UNA DEGRADACIÓN DETERMINADA DURANTE LAS OPERACIONES DE ENVASADO

La « buena firmeza » de las frutas envasadas esta ligado a la degradación de las protope tinas. Esta degradación depende del tipo de protopectinas pero también de la duración y temp ratura de esterilización.

Usando la formula

$$\log \frac{\theta t_1}{\theta t_2} = \frac{t_2 - t_1}{\zeta} \qquad (1$$

establecida por M. Loncin (1961) para la destrucción de microorganismos, es posible calcular en el caso de la degradación de la protopectina de las frutas.

En el presente trabajo, este factor ha sido determinado para dos albaricoques (variedade *Muscat de Provence* y *Canino*) y para dos melorotones (uno prisco : variedad *Fairhaven*, y do pavia : variedades *Shasta* y *Babygold 6*) estudiando experimentalmente la degradación de esa frutas, en dos temperatures diferentes.

Conocer este factor permite prever la duración de esterilización que a una temperatur dada, conociendo el tiempo necesario para obtener la misma degradación a otra temperatura permitira obtener un porcentaje determinado de degradación de la protopectina.

De la formula (1) se deduce :

$$\theta_t = 10^{\log \theta_{ref} + \frac{t_{ref}}{\zeta} - \frac{t}{\zeta}} \qquad (2$$

Los valores obtenidos para ζ son :

Muscat de Provence	$\zeta = 32^{o}C$
Canino	$\zeta = 28^{o}C$
P. Shasta	$\zeta = 45^{o}C$
Fairhaven	$\zeta = 24^{o}C$
P. Babygold 6 ...	$\zeta = 149^{o}C$

La degradación de las protopectinas es sensiblemente identica para las dos variedades de albaricoque estudiados, pero *Canino* es mas sensible a una llevación de temperature que *Muscat de Provence.*

En cuanto a los melocotones, los resultados obtenidos confirman los comportamientos muy diferentes del tipo prisco y del tipo pavia con respecto a las operaciones de envasado y ponen también en relieve la importancia del tipo de protopectina segùn el estado de madurez.

RIASSUNTO

SULLA DEGRADAZIONE TERMICA DELLA PROTOPECTINA DEI FRUTTI A NOCCIOLO. APPLICAZIONE ALLA PREVISIONE DI UNA DEGRADAZIONE DATA DURANTE LE OPERAZIONI D'APPERTIZZAZIONE

La buona fermezza dei frutti appertizzati dipende della degradazione delle loro protopectine, la quale dipende a sua volta della natura della protopectina ma anche della durata e della temperatura di sterilizzazione.

Considerando il rapporto :

$$\log \frac{\theta t_1}{\theta t_2} = \frac{t_2 - t_1}{\zeta} \qquad (1)$$

stabilito da M. Loncin (1961) per la distruzione dei microorganismi, è possibile calcolare ζ nel caso della degradazione della protopectina dei frutti.

Nella presente relazione questo fattore è stato determinato per sue varietà di albicocche (*Muscat de Provence* e *Canino*) e per tre varietà di pesche (una pesca spiccagnola : varietà *Fairhaven*, e due duracine : varietà *Shasta* e *Babygold 6*) studiando in modo sperimentale la degradazione di questi frutti a due temperature diverse.

La conoscenza di questo fattore permette di prevedere la durate di sterilizzazione la quale, ad una data temperatura, permettera di ottenere una percentuale determinata di degradazion della protopectina conoscendo il tempo necessario per ottenere la stessa degradazione ad une temperatura diversa. Dal rapporto (1) scaturisce infatti :

$$\theta t = 10^{\log \theta_{ref} + \frac{t_{ref}}{\zeta} - \frac{t}{\zeta}} \qquad (2)$$

I valori ottenuti per ζ sono :

Muscat de Provence	$\zeta = 32^{o}C$
Canino	$\zeta = 28^{o}C$
P. Shasta	$\zeta = 45^{o}C$
Fairhaven.....	$\zeta = 24^{o}C$
P. Babygold 6	$\zeta = 149^{o}C$

La degradazione delle protopectine è sensibilmente identica per le due varietà di albicocche in questione, ma la varietà *Canino* è più sensibile della *Muscat de Provence* ad un aumento di temperatura.

Per le pesche, i risultati ottenuti confermano i comportamenti molto diversi della spiccagnola e della duracina in fase d'appertizzazione ; questi risultati mettono ugualmente in risalto l'importanza della natura della protopectina a seconda del grado di maturità.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Loncin M., 1961. *Les opérations unitaires du génie chimique : destruction thermique des microorganismes.* Dunod éditeur, Paris, 336-347.

Souty M., Poggi A., Breuils L., 1967. Problèmes se rapportant à la technologie des pêches de conserve : connaissance du matériel végétal. *Bull. tech. Inform.* (220), 505-522.

Souty M., André P., Poggi A., Breuils L., 1969. Aptitudes de quelques variétés d'abricots à l'élaboration de fruits au sirop. II. Observations sur le comportement de quelques variétés. *Industr. aliment. agric.* (5), 669-677.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (1), 53-58.

VARIATION DE LA COMPOSITION EN CATIONS ET EN ACIDES ORGANIQUES NON CÉTONIQUES DES POINTES DE TURIONS D'*ASPARAGUS OFFICINALIS* L. SELON LEUR STADE DE MATURITÉ

C. FLANZY et P. BÉNARD

avec la collaboration technique de Geneviève Migliori et P. Perry

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, 84 - Montfavet
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Des pointes de turions de l'espèce *Asparagus officinalis* L., variété *Blanche hâtive d'Argenteuil* sont prélevées aux trois stades de maturité définis par leur coloration : blanche, violette, verte.

Des analyses portant sur la teneur en eau, le poids des cendres, les cations, l'anion phosphate et les acides organiques non cétoniques, sont réalisées sur les lots ainsi consitués. Entre les stades blanc et vert, des enrichissements en K, Mg, citrate, phosphate, sont enregistrés ; dans le même temps, l'acidité totale croît de 10 p. 100. Citrate, phosphate, malate constituent 80 p. 100 de l'acidité dosée.

INTRODUCTION

La conserverie traite actuellement, en France, environ 10 p. 100 de la production annuelle d'asperges. La faiblesse de ce pourcentage est due à l'insuffisance des tonnages que les conserveurs peuvent se procurer ; en effet, la majorité de la production nationale est absorbée par la consommation intérieure et l'exportation en frais (Vuatrin, 1967). Il est cependant vraisemblable que le marché de l'asperge de conserve se développera assez rapidement. C'est pourquoi l'étude des aptitudes technologiques de cette plante semble souhaitable. Si la connaissance de l'asperge tant sur le plan génétique (Thévenin, 1967) que sur le plan cultural (Marsolat, 1958 ;

CHESNEAU, 1962) est assez avancée, les documents relatifs à sa composition physico-chimique sont, apparemment, limités (CAUSERET, 1960 ; FRANCIS, 1967). Or, il nous paraît nécessaire de connaître les caractéristiques physico-chimiques d'un matériel végétal avant de le soumettre à un traitement technologique. C'est ainsi que, dans le cas de l'Asperge, il est intéressant de suivre l'évolution biochimique des turions en fonction de leur coloration ; en effet, la teneur en substrats liés à la photosynthèse peut être influencée par la qualité des pigments qui apparaissent.

L'étude de la composition de pointes de turions d'asperges aux trois stades de maturation : blanc, violet (pigments anthocyaniques prédominants), vert (pigments chlorophylliens prédominants) fait l'objet de ce travail.

TECHNIQUES

Depuis trois ans (1967 à 1969), le matériel végétal nécessaire aux essais est fourni par l'aspergeraie, créée en 1959, du Domaine expérimental I. N. R. A. de Pech-Rouge (Narbonne). Le terrain où se trouve cette plantation est sablonneux et il est submergé par l'eau de mer, à plusieurs reprises, chaque année durant la période hivernale. La variété d'asperges implantée est la *Blanche hâtive d'Argenteuil* dont la période de pleine production se situe en avril-mai. Les prélèvements d'échantillons ont lieu à cette époque.

Des pointes (5 à 10 cm) de turions sont recueillies aux trois stades de coloration : blanc, violet, vert. Les pointes de même couleur sont rassemblées et homogénéisées en lots de 100 grammes chacun. Le premier de ces lots sert à déterminer le poids sec, le poids des cendres et la teneur en cations minéraux. Un deuxième lot est fixé à l'éthanol bouillant à 95° GL en vue du dosage ultérieur des acides organiques non cétoniques.

Les déterminations d'extraits secs sont effectuées sur les échantillons ayant séjourné à l'étuve à 100°C jusqu'à poids constant ; ces extraits sont alors placés au four à 520°, en vue de la mesure du poids des cendres. Les cations K, Na, Ca sont dosés sur les cendres après reprise par HCl 2 N, évaporation à sec, dissolution dans l'eau distillée, passage sur résines échangeuses de cations (Dowex 50, forme H^+), élution par HCl 2 N et titration par photométrie de flamme. Le magnésium est dosé par la méthode à l'E. D. T. A. (référence, méthode CASTINA MARIA 1962), leurs valeurs semblent élevées et ne sont données qu'à titre indicatif.

Les acides organiques sont dosés selon la technique de ROUX-LESAINT (1959) légèrement modifiée. En effet, après purification sur une colonne échangeuse de cations (Permutite 50 — forme H^+), l'extrait hydroalcoolique est titré potentiométriquement puis divisé en deux parties aliquotes. Les acides organiques contenus dans la première sont fixés par passage sur une colonne échangeuse d'anions Dowex 1 — forme $HCOO^-$ (FAUCONNEAU, 1958). Ils sont ensuite séparés par élution au moyen d'une série de solutions aqueuses de concentration croissante en acide formique (100 ml, 0,25 N — 150 ml, 0,5 N — 200 ml, 1,5 N — 300 ml, 3 N). La deuxième partie aliquote est traitée selon la technique de BOVE et RAVEUX (1957) de façon à séparer les acides organiques par chromatographie de partage sur gel de silice.

Après dosage acidimétrique, les acides élués sont rechromatographiés sur papier en présence d'acides témoins puis révélés par le mélange de PASKOVA et MUNK (1960). Le réactif au molybdate d'ammonium (moblydate d'ammonium 5 p. 100, benzidine acétique 5 p. 1 000, acétate de sodium — 1, 1,1) est utilisé pour l'identification des phosphates.

RÉSULTATS

Le tableau 1 donne les résultats relatifs au poids sec, au poids des cendres et aux teneurs en cations des échantillons 1968 et 1969 ; les valeurs obtenues pour les deux années sont comparables. Cependant, alors que les poids de cendres et les teneurs en Mg sont supérieurs en 1969 à ceux de 1968, l'inverse se produit pour les teneurs en K.

L'extrait sec passe par un maximum au stade violet. Poids de cendres et K croissent du stade blanc au stade vert. Le gain de poids de cendres entre le stade blanc

TABLEAU I

Évolution des cations contenus dans les pointes de turions d'asperge au cours de leur maturation

Les résultats sont exprimés en g pour 100 g de matière fraîche

	1968			1969		
	Blanc	Violet	Vert	Blanc	Violet	Vert
Poids sec	5,00	7,50	5,00	5,00	6,00	5,00
Cendres	0,68	0,71	0,74	0,83	0,84	0,87
Potassium	0,38	0,40	0,42	0,32	0,35	0,36
Sodium	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Calcium	0,03	0,04	0,03	0,05	0,04	0,03
Magnésium	0,24	0,26	0,26	0,26	0,28	0,27

et le stade vert, correspond au bilan des gains de cations entre ces deux stades de coloration.

TABLEAU 2

Évolution de certains acides contenus dans les pointes de turions d'asperge au cours de leur maturation

Les résultats sont exprimés en microéquivalents pour 100 g. de matière fraîche.

	1967			1968			1969		
	Blanc	Violet	Vert	Blanc	Violet	Vert	Blanc	Violet	Vert
Acidité totale titrée potentiométriquement	9 310	10 400	10 757	8 700	9 410	9 650	9 200	8 625	9 150
Acide malique	70	370	445	1 320	770	690	550	540	990
Acide citrique	1 620	1 860	1 940	1 100	1 970	2 010	1 600	1 720	1 800
Acide succinique	220	150	210	70	110	190	100	160	210
Acide pyrrolidone-5-carboxylique	615	490	550	700	760	1 000	350	490	530
Acides shikimique, quinique, glycérique	120	—	130	60	130	165	95	140	170
$PO_4\equiv$	710	1 070	1 550	760	820	855	720	1 100	1 420
Acidité dosée	3 360	3 939	4 820	4 008	4 560	4 910	3 420	4 150	5 120
ρ	36	37	44	46	48,5	51	37	48	56

Les résultats concernant les anions dosés dans les échantillons 1967, 1968, 1969 sont rapportés dans le tableau 2.

Les séparations d'acides organiques sur gel de silice présentent des blancs très importants dès le troisième mélange éluant. En conséquence, les teneurs en acides retenues sont celles obtenues par chromatographie sur Dowex, à l'exception des valeurs relatives au fumarate et au succinate.

L'acidité totale titrée croît, généralement, du stade blanc au stade vert (la valeur obtenue pour l'échantillon blanc 1969 paraît anormalement élevée pour l'année). L'acidité organique et l'ion phosphate dosés ne représentent que 50 p. 100 environ de l'acidité titrée. Le rendement de récupération $\frac{\text{acidité dosée}}{\text{acidité titrée}}$ semble croître du stade blanc au stade violet. Les teneurs en citrate, phosphate et celles de l'ensemble shikimate-quinate-glycérate augmentent du stade blanc au stade vert. Il en est de même pour le malate sauf en 1968 où ce phénomène est inversé. Les teneurs en acide succinique et en acide pyrrolidone-5-carboxylique croissent parfois avec la maturation. En 1969, le fumarate semble suivre une évolution identique. En 1968, les teneurs en $PO_4^{\equiv}$ sont plus basses au stade violet et vert que leurs correspondantes en 1967 et 1969. Ce fait peut être en relation avec la longue période de sécheresse qui a précédé la récolte 1968 : en effet, de mai 1967 à avril 1968 inclus, 178 mm de pluie ont été enregistrés alors que pour les périodes correspondantes des récoltes 1967 et 1969, les précipitations ont été respectivement de 513 et 828 mm.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La teneur en eau des pointes (blanches et vertes) de turions d'asperge se situe aux environs de 95 g pour 100 g de matière fraîche. Elle est légèrement moins élevée pour le stade violet ; cette baisse de la teneur en eau peut conduire à une concentration apparente en cations. D'une façon générale, un enrichissement en K et Mg a lieu entre les stades blanc et vert.

Fréquemment, l'acidité totale augmente de 10 p. 100 entre les deux stades extrêmes de coloration. L'acidité dosée, qui ne représente que 40 à 60 p. 100 de l'acidité totale, est formée des anions suivants, énumérés par ordre de teneurs décroissantes : citrate (30 à 50 p. 100 de l'acidité dosée), phosphate (20 à 30 p. 100), malate (10 à 30 p. 100), pyrrolidone-5-carboxylate (10 à 20 p. 100), succinate (4 à 5 p. 100) et le groupe shikimate-quinate-glycérate (3 à 4 p. 100.)

L'évolution de certains acides (de même que celle du poids des cendres) semble directement liée aux conditions climatiques de l'année. Il en est ainsi pour le phosphate dont la teneur double entre les stades blanc et vert, en 1967 et 1969, alors que son taux d'augmentation atteint seulement 15 p. 100 en 1968. Inversement, le coefficient d'augmentation du citrate en 1968 est bien supérieur à celui des deux autres années.

Généralement, les teneurs en citrate, succinate, fumarate et malate augmentent lorsque les pigments apparaissent. Il pourrait donc exister une relation entre l'enrichissement des pointes d'asperges en acides organiques du cycle de Krebs et l'activité photosynthétique des turions.

La teneur en acide pyrrolidone-5-carboxylique croît régulièrement en 1968 et 1969 avec la maturation. Elle s'élève de 40 à 50 p. 100 durant ces deux années, entre les stades blanc et vert. Ces augmentations sont-elles seulement dues à la trans-

formation de la glutamine au cours du passage des échantillons sur résines échangeuses de cations (Coïc *et al.*, 1961), ou ne peuvent-elles aussi exprimer le fait que cet acide participe effectivement au métabolisme intermédiaire de la plante (Jolivet, 1969) ?

Enfin, le groupe shikimate-quinate-glycérate, précurseur possible de composés aromatiques, voit ses teneurs, toujours faibles, augmenter légèrement en cours de maturation.

Il serait souhaitable, pour une meilleure connaissance du matériel végétal étudié, de compléter les bilans d'acides organiques et de cations des turions d'asperges, à leurs trois stades de coloration, par la détermination des teneurs en certains composés comme les glucides, les acides aminés, l'anion chlore (dans le cas particulier d'une plantation en terrain salé).

Reçu pour publication en janvier 1970.

SUMMARY

VARIATIONS OF THE COMPOSITION, IN CATIONS AND NON-KETONIC ACIDS, OF ASPARAGUS TIPS OF *ASPARAGUS OFFICINALIS* L., ACCORDING TO THE DEGREE OF THEIR RIPENESS

Asparagus tips of the variety *Asparagus officinalis* L., *Early White Argenteuil* variety, are taken at the three stages of ripeness defined by their colouring : white, violet, green.

Analyses on the water content, the weight of ashes, the cations, anion phosphate and the non-ketonic organic acids are carried out on the batches thus made up. In the white and green stages one registers an improvement in K, Mg, citrate and phosphate ; at the same time the total acidity increases by 10 p. 100. Citrate and phosphate make up 80 p. 100 of the acidity dose.

RESUMEN

VARIACION DE LA COMPOSICION EN CATIONES Y EN ACIDOS ORGANICOS NO CETONICOS DE LAS PUNTAS DE LOS TURIONES DE *ASPARAGUS OFFICINALIS* L. DE AURERDO CON EL ESTADO DE MADUREZ

La puntas de los turiones de *Asparagus officinalis* L. variedad « *Blanche hâtive d'Argenteuil* » son cortados a tres estados de madurez diferentes, definidos por la coloracion blanca, violeta y verde.

De esos lotes se hacen analisis del contenido en agua, peso de las cenizas, cationes, anion fosfato y acidos organicos no cetonicos.

Entre los estados blanco y verde se ha notado un enriquecimiento en K, Mg, citrato y fosfato. Al mismo tiempo, la acidez total aumenta de 10 p. 100. Citrato fosfato y malato constituyen 80 p. 100 de la acidez medida.

RIASSUNTO

VARIAZIONE DELLA COMPOSIZIONE, IN CATIONI E IN ACIDI ORGANICI NON CETONICI, DELLE PUNTE DI TURIONI DI *ASPARAGUS OFFICINALIS* L., A SECONDA DEL LORO STADIO DI MATURITÁ

Delle punte di turioni della specie *Asparagus officinalis* L., varietà *Bianca Primaticcia di Argenteuil*, sono prelevate ai tre stadi di maturità definita dalla loro colorazione : bianca, violetta, verde.

Delle analisi riguardanti il tenore in acqua, il peso delle ceneri, i cationi, gli anioni di fosfato

e gli acidi organici non cetonici sono realizzate sulle punte di turioni cosi' raggruppate. Tra gli stadi bianco e verde si notano degli arricchimenti in K, Mg, citrato e fosfato ; l'acidità totale aumenta allo stesso tempo del 10 p. 100 : citrato e fosfato costituiscono il 80 p. 100 dell'acidité dosata.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bove J., Raveux R., 1957. La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_1 à C_6 par chromatographie de partage sur colonne de silice. II Nouvelle technique proposée. *Bull. Soc. chim. Fr.* 376-381.

Causeret J., 1960. Tableaux de composition des fruits et légumes. in : La valeur alimentaire et thérapeutique des fruits et légumes. *Alimentation et Agriculture.* O. E. C. E. 3, rue André-Pascal, Paris 16e

Chesneau G., 1962. L'asperge. *Pépiniéristes, Horticulteurs, Maraîchers.*, **32**, 1109-1113.

Coïc Y., Lesaint Ch., Le Roux F., 1961. Comparaison des feuilles, entre-nœuds et nœuds du bl au point de vue acides organiques et cations minéraux peu avant la floraison. *C. R. Acad. Sci.*, **252** 4031-4033.

Jolivet E., 1969. *Métabolisme des acides organiques et des acides aminés libres chez le tubercule de pomme de terre* (Solanum Tuberosum *L.*) *au cours de la cessation spontanée de son repos végétal et au cours de la rupture provoquée de son repos par la rindite.* Thèse, Institut national de la Recherche agronomique, Paris

Fauconneau G., 1958. Les acides organiques des plantes fourragères. *Ann. agron. Suppl.*, **1**, 1-13.

Francis F. J., 1967. Anthocyanins of Asparagus. *J. Food Sci.*, **32**, 430-431.

Marsolat R., 1958. L'asperge. Sa culture dans la région méridionale. *Journées Maraîchères méridionales.* Montpellier. Direction des Services agricoles de l'Hérault.

Paskova J., Munk V., 1960. J. *Chromatogr.*, **4**, 241-243.

Roux L., Lesaint Christiane., 1959. Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques chez les végétaux. *Ann. Physiol. vég.*, **1**, 83-92.

Thévenin L., 1967. Les problèmes d'amélioration chez *Asparagus officinalis*. II. Biologie et amélioration. *Ann. Amélior. Plantes*, **17**, 33-66.

Vuatrin B., 1967. *La culture de l'asperge pour la conserve.* Centre technique des Conserves des Produits agricoles. 71, avenue Général-Leclerc, Paris 14e.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (1), 59-68.

COMPARAISON DES SUBSTANCES VOLATILES ÉMISES AU COURS DE LA VINIFICATION DE RAISINS FOULÉS ET NON FOULÉS

C. JOURET et M. MOUTOUNET

avec la collaboration technique de H. CASSAGNE et M. SABATIER

Laboratoire de Technologie des Produits végétaux,
Station d'Agronomie et d'Œnologie, 67, boulevard Deltour, 31 - Toulouse
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

La composition des substances volatiles légères entraînées par le gaz carbonique au cours de la vinification de raisins foulés et non foulés (macération carbonique) a été étudiée par des méthodes analytiques chimiques et par chromatographie en phase gazeuse.

Comparativement à la vinification des raisins foulés, la technique par macération carbonique se caractérise par une émission moins importante d'acides, d'éthanol, de méthanol et d'alcools supérieurs ; mais, par contre, une quantité plus grande d'esters et d'un composé en cours d'identification, possédant au moins une double liaison, est émise.

En conséquence, le rapport des alcools supérieurs aux esters totaux reste voisin de l'unité dans le cas de la macération carbonique mais est de 2 à 4 fois plus élevé pour la vinification avec foulage de la vendange.

INTRODUCTION

La détermination comparative des substances volatiles entraînées par le gaz carbonique au cours de la vinification entre dans le cadre d'un travail d'ensemble sur l'élaboration de vin à partir de raisins entiers, technique dite « par macération carbonique » (M. FLANZY, 1935).

L'étude générale entreprise doit amener une meilleure connaissance des données pratiques de la vinification, de la composition des vins et des phénomènes biochimiques particuliers aux raisins entiers placés en anaérobiose carbonique (P. BÉNARD,

C. JOURET, 1963 ; C. FLANZY, P. ANDRÉ, 1965 ; P. ANDRÉ *et al.*, 1967 ; C. FLANZY *et al.*, 1967 ; C. FLANZY *et al.*, 1968).

D'autre part, l'intérêt technologique de la récupération des substances volatiles émises au cours de la vinification pourra ainsi être précisé ; jusqu'ici, les études ont porté uniquement sur des cuvées de vendange foulée (P. MENGAUD, 1949 ; A. D. WEBB, C. S. OUGH, 1962 ; G. A. PAVLOV *et al.*, 1967).

Dans cette note, seule la composition des substances volatiles recueillies sera envisagée.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les expérimentations ont été effectuées durant les vendanges de 1967 et 1968 à la cave expérimentale de l'I. N. R. A. de Pech-Rouge à Gruissan (Aude).

Le système de piégeage comprend un tube collecteur fixé sur les trappes hermétiquement fermées de cuves de vinification de 110 hl, dirigeant les gaz émis et les substances volatiles entraînées à travers trois pièges placés en série : l'un, servant de détendeur, est à la température de la cave ; le second est plongé dans un bain de saumure maintenu à + 4°C ; le troisième est placé dans un congélateur à la température de — 30°C.

L'efficacité de la récupération a été testée à l'aide d'un quatrième piège à — 80°C (neige carbonique et acétone) où aucun condensat n'a été recueilli.

Pour estimer la quantité de gaz non condensable émise, un compteur fait suite au dernier piège.

Toute la tuyauterie et les pièges sont en acier inoxydable et les joints sont en téflon.

Les cuves ayant été remplies de façon identique selon le protocole déjà cité (P. BÉNARD, C. JOURET, 1963) la collecte des échantillons a été effectuée deux fois par jour.

TECHNIQUES ANALYTIQUES

Les échantillons récupérés ont été étudiés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer 2F/F6 muni d'un détecteur à ionisation de flamme.

La séparation et l'identification des composés ont été effectuées à l'aide de diverses colonnes : une colonne capillaire à support imprégné de carbowax 20M (Scot 20M) de 50 pieds aux températures isothermes de 50°C et 100°C ; une colonne Scot de carbowax 1 540 de 50 pieds à 50°C ; une colonne de 2 mètres de longueur et de 1/4 ″ de diamètre en acier inoxydable de D.E.G.S. à 15 p. 100 sur chromosorb 60-80 mesh à 100°C.

La technique de l' « espace de tête » par injection gazeuse a permis la mise en évidence du plus grand nombre de pics. Les meilleurs conditions de relargage ont été obtenues en ramenant la richesse des échantillons à 15 p. 100 en éthanol et en saturant le liquide par du chlorure de sodium. 40 ml au total sont ainsi préparés dans des fioles à antibiotique de 50 ml et la phase vapeur surmontant le liquide est injectée directement.

Cette technique se prête bien à la caractérisation des groupes fonctionnels suivant les tests cités par BASSETTE *et al.* (1962), HOFF et FEIT (1963), R. M. IKEDA *et al.* (1964).

Pour comparer d'une façon plus précise les échantillons globaux récupérés, les échantillons journaliers de chaque piège ont été rassemblés et chromatographiés suivant la technique précédente.

Cette analyse a été complétée par un dosage quantitatif chromatographique de certains constituants mis en évidence, par injection directe du liquide :

le propanol et l'isobutanol sur colonne Scot 20 M à 45°C ;

le méthyl-2 butanol-1, le méthyl-3 butanol-1, et l'acétal sur une colonne d'E.S.D. (érythritol, sorbitol, diglycérol) à 55°C.

L'acétate d'éthyle est séparé de tous les autres constituants en mettant en série une colonne de 1 m de carbowax 1 500 et une colonne de 1 m d'E. S. D. à 55°C.

La teneur en méthanol a été déterminée à l'aide d'une colonne de porapak Q à 55°C.

TABLEAU I

Essai 1968	Nature de vinification	Poids vendange (kg)	Volume de vin total (hl)	Degré alcoolique du vin (°GL)	Gaz carbonique émis (m^3)	Volume total des condensats (l)	Piège — 30°C Volume des condensats (l)	Éthanol total recueilli dans les pièges	Piège — 30°C Éthanol recueilli (l)	Pourcentage d'éthanol recueilli par rapport à l'éthanol formé dans la vinification
1er	Macération carbonique	7 884	63,0	11°70	285	7,9	5,1	2,55	2,16	0,35
	Vendange foulée	7 912	61,6	11°95	291	7,6	4,4	2,87	2,23	0,39
2e	Macération carbonique	4 692	33,5	14°60	135	5,3	3,3	2,93	1,80	0,60
	Vendange foulée	4 895	36,0	14°00	225	7,0	4,3	3,31	2,60	0,66

NB-Les degrés alcooliques sont ceux des vins finis (après la deuxième phase fermentaire pour les vins des raisins entiers)
Les volumes de CO_2 rapportés sont ceux obtenus durant la 1re phase de fermentation.

L'éthanol a servi d'étalon interne pour le méthanol, le butanol-1 pour les autres dosages. Le dosage de l'éthanol a été effectué par oxydation chromique (M. FLANZY *et al.*, 1965), celui des esters totaux et des aldéhydes suivant les techniques analytiques de l'A. O. A. C. (1965) utilisées pour les eaux-de-vie.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 1 rassemble les données générales des deux séries d'essais effectués aux vendanges de 1968. Pour ne pas surcharger la publication, les observations sur l'ensemble des 2 années étant concordantes, les essais de 1967 ne sont pas rapportés.

TABLEAU 2

N° pics	Nature des pics	1er Essai 1968		2e Essai 1968	
		Macération carbonique	Vendange foulée	Macération carbonique	Vendange foulée
1	?	traces	traces	traces	traces
2	Éthanal	—	—	—	—
3	?	0	0	3,3	2,8
4	Formiate d'éthyle + isovéraldéhyde	2,2	1,1	3,7	3,6
5	Acétate de méthyle + acétone	3,0	5,0	3,3	6,4
6	?	0	0	traces	traces
7	?	0	0	traces	0
8	Acétate d'éthyle + méthanol + acétal	8,7	2,5	7,4	5,2
9	Éthanol	—	—	—	—
10	?	traces	0	0	0
11	?	traces	0	traces	0
12	?	traces	traces	0,4	traces
13	Acétate d'isobutyle	9,7	3,6	10	5,6
14	Propanol 1	—	5,0	—	8,8
15	Isovalérate d'éthyle	11,0	7,2	24,0	6,8
16	?	0,7	traces	0,7	0
17	?	0,2	0	traces	traces
18	Méthyl-2 propanol 1	30,2	55,0	37,4	58,0
19	Acétate d'isoamyle	45,7	18,2	44,0	18,4
20	Méthyl-2 et méthyl-3 butanol 1	33,0	40,3	31,5	39,6
21	Caproate d'éthyle	16,0	9,6	27,0	10,0
22	« Composé éthylénique »	4,5	1,4	16,6	1,2
23	Hexanol	—	—	—	—
24	Caprylate d'éthyle	—	—	—	—

(1) Le tiret indique que le composé a été mis en évidence ou dosé sur d'autres colonnes chromatographiques ou par des techniques analytiques chimiques.

En remarquant que les masses de vendanges mises en œuvre pour les deux essais n'ont pas été semblables, on peut noter que le taux en éthanol des condensats recueillis est fonction de la quantité globale des sucres du moût, mais également de la teneur en alcool du vin fini.

Cependant l'éthanol récupéré dans les pièges de la vendange foulée est en quantité un peu plus importante. Ceci s'explique aisément compte tenu que la fermentation de la vendange foulée, contrairement à celle de la macération carbonique, est complète durant la phase étudiée et produit, par suite, plus d'éthanol et de gaz carbonique.

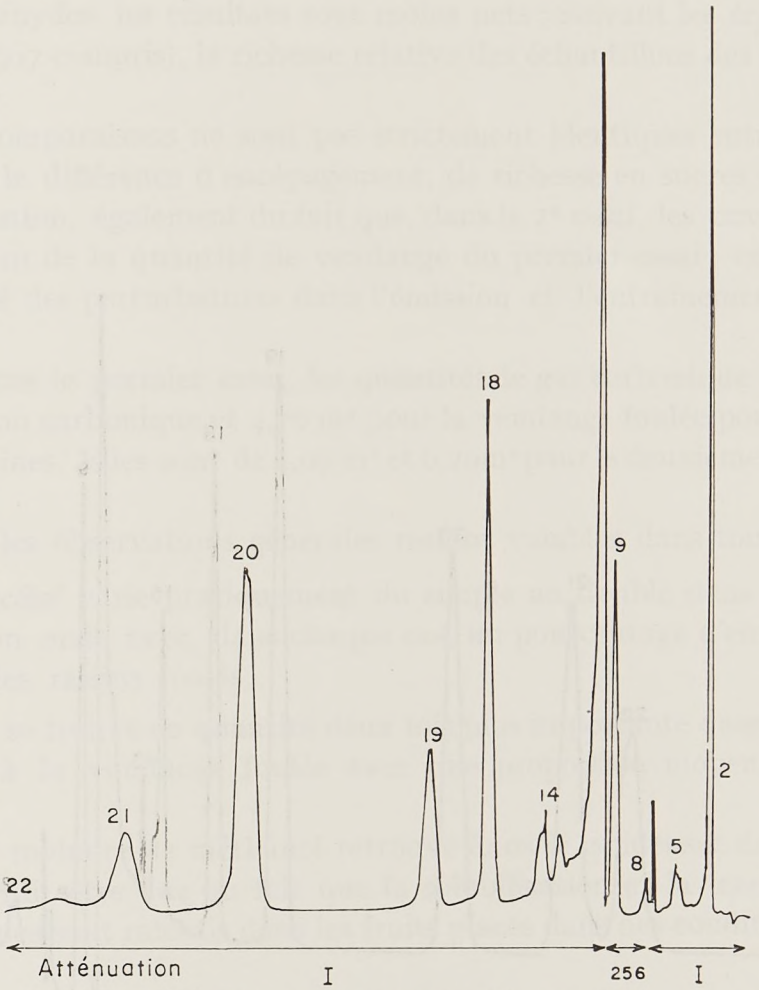


FIG. 1. — *Échantillons raisins foulés ; 2e essai 1968*
Chromatographe Perkin Elmer 2F/F6 ; colonne Scot 20 M 50'
Température 55°C. Quantité d'échantillon : 1 ml « par espace de tête »

L'étude qualitative de tous les condensats journaliers recueillis dans les pièges a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse suivant les techniques précédemment décrites.

Bien que la concentration globale des composés volatils croît en raison inverse de la température des pièges (le piège à — 30°C contient en moyenne 60 p. 100 des substances volatiles totales), et que celle-ci augmente, en outre, au fur et à mesure du déroulement de la fermentation alcoolique, cependant, pour les deux types de vinification, la composition qualitative des condensats ne varie pas ; aussi, les analyses ont été poursuivies seulement sur le mélange des condensats quotidiens des pièges à — 30°C pour chacun des essais.

La chromatographie en phase gazeuse a permis de mettre en évidence 24 composés à l'aide des colonnes utilisées ; les chromatogrammes (fig. 1 et 2) représentent les

résultats obtenus suivant la technique de l' « espace de tête » sur une colonne Sco de carbowax 20 M. Seuls les pics les plus importants, quantitativement, ont pu êtr numérotés dans le fac-similé des chromatogrammes.

Parmi ceux-ci, le pic n° 22 n'a pas été encore identifié. Il ne réagit pas aux test caractéristiques des acétals, des esters, des composés carbonylés, des alcools primaire et secondaires.

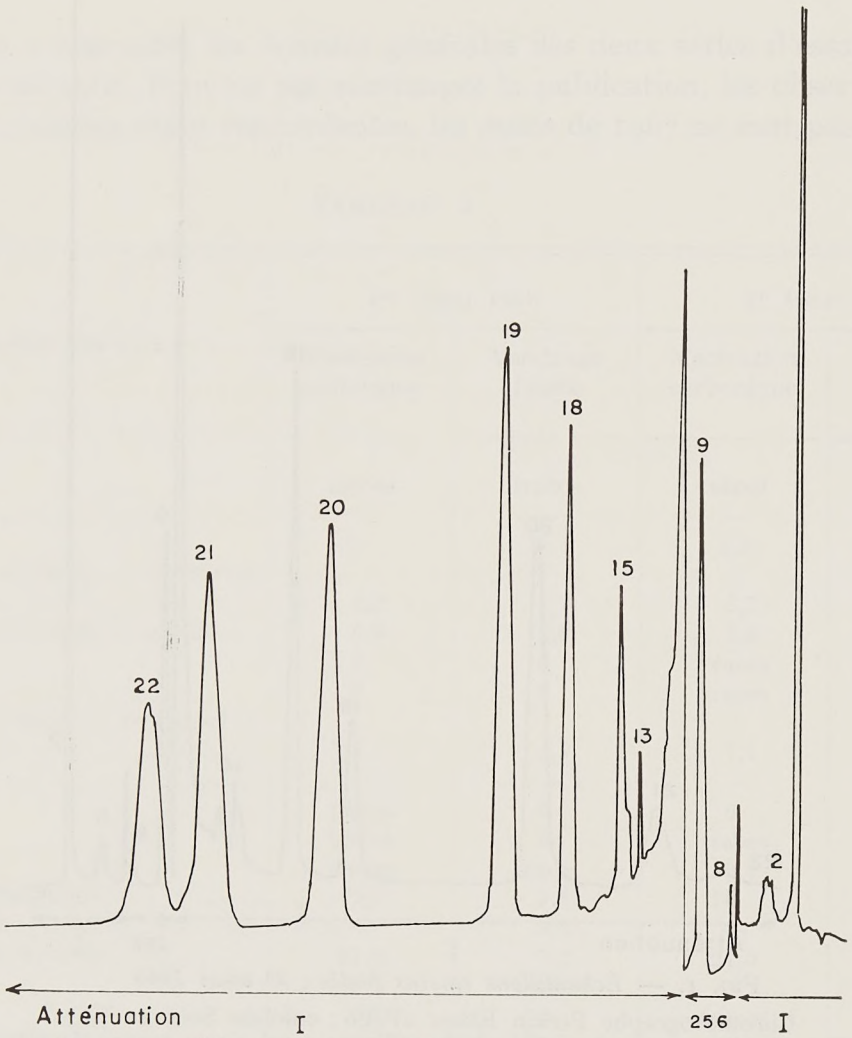


Fig. 2. — *Échantillon macération carbonique ; 2e essai 1968*
Chromatographe Perkin-Elmer 2F/F6 ; colonne Scot 20 M 50'
Température 55°C. Quantité d'échantillon : 1 ml « par espace de tête »

Par contre, il est le seul pic à disparaître après un traitement de l'échantillon à froid par le permanganate de potassium ou le brome, ce qui peut laisser supposer que le composé détecté possède au moins une liaison éthylénique. La recherche de son identification doit se poursuivre à l'aide de techniques spectrophotométriques.

Le tableau 2 donne le pourcentage des pics, identifiés ou non, par rapport à celui de l'éthanol.

Le tableau 3 rassemble les résultats des analyses quantitatives effectuées sur certains composés des mêmes échantillons.

Les chiffres sont donnés en richesse du liquide recueilli (g/l) et en quantité totale (grammes).

On peut faire un certain nombre d'observations concordantes entre les deux techniques d'analyses.

Le condensat de la vendange foulée contient plus d'acides (les doses restent très faibles), d'éthanol, d'acétal, de méthanol et d'alcools supérieurs.

Par contre, le condensat de macération carbonique est plus riche en esters et en composé « éthylénique ».

Pour les aldéhydes, les résultats sont moins nets ; suivant les échantillons examinés (ceux de 1967 compris), la richesse relative des échantillons des deux modes de vinification varie.

Certes, les comparaisons ne sont pas strictement identiques entre les 2 essais ; cela provient de la différence d'encépagement, de richesse en sucres et de température de fermentation, également du fait que, dans le 2e essai, les cuves contiennent la moitié seulement de la quantité de vendange du premier essai ; ce qui a certainement provoqué des perturbations dans l'émission et l'entraînement du gaz carbonique.

En effet, dans le premier essai, les quantités de gaz carbonique émises (4,50 m^3 pour la macération carbonique et 4,70 m^3 pour la vendange foulée pour un hectolitre de vin) sont voisines. Elles sont de 4,00 m^3 et 6,20m^3 pour le deuxième essai, donc très différentes.

Cependant, les observations générales restent valables dans tous les essais :

Le taux d'*acétal* varie pratiquement du simple au double dans les deux séries d'expérimentation mais avec, dans chaque cas, un pourcentage d'environ 25 p. 100 supérieur pour les raisins foulés.

Le *méthanol* se trouve en quantité deux fois plus importante dans les condensats correspondants à la vendange foulée avec une proportion moyenne de 1 g par litre.

La quantité moindre de méthanol retrouvé dans le condensat de la macération carbonique pourrait être due au fait que la solubilisation et la transformation des composés pectiques sont ralentis dans les fruits placés dans des conditions anaérobies (Ulrich, 1965).

Pour les *alcools supérieurs*, mis à part le méthyl-2 butanol-1 dont les teneurs restent relativement voisines, le propanol, le méthyl-2 propanol-1 et le méthyl-3 butanol-1 se retrouvent en quantité plus importante dans la vendange foulée ; le condensat de vendange foulée contient 30 p. 100 de plus d'alcools supérieurs totaux que celui de macération carbonique.

Une différence importante apparaît dans les résultats analytiques relatifs aux *esters* : dans le premier essai, les échantillons de macération carbonique contiennent environ trois fois plus d'esters totaux et d'acétate d'éthyle. Dans le deuxième essai, le taux global d'esters présente une moins grande différence avec une quantité identique d'acétate d'éthyle entre vendange foulée et macération carbonique (9,08 g).

Par contre, la quantité d'esters représentée par la différence entre tous les esters totaux et l'acétate d'éthyle est similaire pour les deux essais et elle est deux fois plus élevée pour la « macération carbonique ».

Le rapport des alcools supérieurs aux esters totaux est de 1,19 et 1,20 pour les 2 essais de macération carbonique et de 4,5 et 2,36 pour les 2 essais de vendange foulée.

3

Essais	Type de vinification	Éthanol	Acides totaux	Aldéhydes totales	Acétal	Méthanol	Méthyl-2 propanol	Méthyl-2 butanol-1	Méthyl-3 butanol-1	Alcools supér. totaux	Acétate d'éthyle	Autres esters	Esters totaux
1er 1968	Macération carbonique	37°70 1 726	0,034 0,18	3,30 16,90	0,14 0,69	0,3 1,9	0,11 0,54	0,87 4,48	0,75 3,84	1,76 9,02	3,49 17,88	2,62 13,43	0,31 1,60	2,93 15,03
	Vendange foulée	53°20 1 786	0,040 0,18	2,07 9,14	0,19 0,82	1,0 4,5	0,22 0,96	1,54 6,80	0,78 3,44	2,27 10,02	4,81 21,22	0,91 4,02	0,14 0,62	1,05 4,64
2e 1968	Macération carbonique	55°60 1 441	0,058 0,19	4,09 13,30	0,37 1,22	0,4 1,3	0,24 0,79	1,03 3,36	0,54 1,76	1,57 5,12	3,38 11,03	2,48 8,08	0,34 1,12	2,82 9,19
	Vendange foulée	60°70 2 081	0,108 0,47	4,37 19,0	0,51 2,20	0,9 4,0	0,43 1,85	1,65 7,15	0,68 2,96	2,04 8,87	4,80 20,83	1,86 8,08	0,16 0,69	2,02 8,78

Pour chacun des échantillons, les résultats analytiques sont exprimés en g/l sur la ligne supérieure (sauf l'a grammes totaux recueillis sur la ligne inférieure.

La présence de quantité plus élevée d'esters dans le condensat de macération carbonique peut n'être due qu'en partie à la fermentation intracellulaire des raisins. En effet, une incidence de l'anaérobiose carbonique et de la fermentation alcoolique lente est la modification de la flore microbienne fermentaire (J. CHAUVET *et al.*, 1963 ; J. MAUGENET, 1969) avec, en particulier, la présence de nombreuses bactéries lactiques et acétiques qui ne provoquent d'ailleurs pas d'acétification du milieu.

Une autre différence importante apparaît pour le « *composé éthylénique* ».

Les échantillons recueillis correspondants à la macération carbonique sont nettement plus riches ; la teneur de l'ensemble des condensats du deuxième essai est quatorze fois plus grande que celle de la vendange foulée.

CONCLUSION

La détermination des composés volatils légers, récupérés au cours de la fermentation de raisins foulés et de raisins non foulés, a permis de mettre en évidence certaines caractéristiques différenciant ces deux types de vinification.

Durant la fermentation de vendange foulée, on recueille plus d'acides, d'éthanol, d'acétal, de méthanol et d'alcools supérieurs.

Par contre, dans la vinification de raisins entiers (macération carbonique) une quantité plus importante d'esters et d'un composé en cours d'identification possédant une liaison éthylénique est émise.

Le rapport des alcools supérieurs aux esters reste ainsi voisin de l'unité dans le cas de la macération carbonique mais est de deux à quatre fois plus élevé dans le cas de vinification de raisins foulés.

Reçu pour publication en février 1970.

SUMMARY

COMPARISON OF THE VOLATILE SUBSTANCES ARISING FROM THE VINIFICATION OF CRUSHED AND UNCRUSHED GRAPES

The composition of light volatile substances carried off by CO_2 during vinification of crushed and uncrushed (CO_2 maceration) grapes has been studied by chemical analysis and by gas chromatography.

Compared with the usual crushing method of vinification, the CO_2 maceration system is characterized by a lesser production of acids, ethanol, acetyl, methanol and higher alcohols ; on the other hand larger amounts of esters, and of a compound having at least one double bond, not yet identified, are produced.

As a result, the ratio between higher alcohols and total esters remains near unity in the case of CO_2 maceration, but is 2 to 4 times higher with the usual grape crushing system.

RESUMEN

COMPARACIÓN DE LAS SUBSTANCIAS VOLÁTILES PRODUCIDAS DURANTE LA VINIFICACIÓN DE UVAS ESTRUJADAS Y NO ESTRUJADAS

La composición de las substancias volátiles livianas arrastradas por el gaz carbónico durante la vinificación de uvas estrujadas y no estrujadas (maceración carbónica) a sido estudiada mediante métodos de análisis quimicos y cromatografia en fase gaseosa.

Comparativamente a la vinificación de uvas estrujadas, la técnica de maceración carbónica se caracteriza por una produción menos importante de ácidos, de etanol, de acetol, de metanol y de alcoholes superiores ; en cambio hay una producción superior de ésteres y de un compuesto, aun no identificado, que tiene por la menos una doble ligadura.

En consecuencia, la proporción de alcoholes superiores comparada a la de ésteres totales, es vecina de la unidad en el caso de la maceración carbónica, pero es de 2 a 4 veces superior en la vinificación con estrujado de la uva.

RIASSUNTO

CONFRONTO TRA LE SOSTANZE VOLATILI EMESSE DURANTE LA VINIFICAZIONE DI UVE PIGIATE E NON PIGIATE

La composizione delle sostanze volatili leggere di cui è all'origine il gas carbonico durante la vinificazione delle uve pigiate e non pigiate (macerazione carbonica), è stata studiata, nella fase gassosa, con dei metodi analitici chimici e cromatografici.

Facendo il confronto con la vinificazione delle uve pigiate, la tecnica della macerazione carbonica è caratterizzata da una emissione meno rilevante di acidi, d'etanolo, di acetali, di metanolo e di alcoli superiori ; d'altro canto viene emessa una più grande quantità di esteri e d'un composto che sta per essere identificato e che possiede almeno una doppia valenza.

Pertanto, il rapporto degli alcoli superiori con gli esteri totali resta vicino all'unità nel caso della macerazione carbonica, ma esso è da 2 a 4 volte più elevato nella vinificazione con pigiatura delle uve.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Bénard P., Chambroy Y., Flanzy C., Jouret C., 1967. Méthode de vinification par macération carbonique. I. Production de jus de goutte en vinification par macération carbonique. II. Production d'alcool en vinification par macération carbonique. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 109-115, 117-123.

Bassette R., Ozeris S., Whitnah C., 1962. Gas chromatography analysis of head space gas of dilute aqueous solutions. *Anal. Chem.*, **34**, 1540-1543.

Bénard P., Jouret C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 85-102.

Chauvet J., Bréchot P., Dupuy P., Madeleine Croson, Irrmann R., 1963. Évolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 237-246.

Flanzy C., André P., 1965. Note sur le métabolisme des raisins en situation d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 173-178.

Flanzy C., André P., Flanzy M., Chambroy Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisins placées en anaérobiose carbonique. I. Influence de la température. II. Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 27-34, 89-107.

Flanzy M., André P., Chambroy Y., 1968. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin en anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 287-297.

Flanzy M., 1935. Nouvelle méthode de vinification. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **21**, 935-938.

Flanzy M., Bouzigues Mme L., Bouzigues H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfochromique. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 397-415.

Hoff J. E., Feit E., D., 1964. New techniques for functional group analysis in gas chromatography syringe reactions. *Anal. Chem.*, **36**, 1002-1008.

Ikeda R. M., Simmons D. E., Grossman J. D., 1964. Removal of alcohols from complex mixtures during gas chromatography. *Anal. Chem.*, **36**, 2188-2189.

Official Methods of Analysis. A. O. A. C., 1965 (10e édit.). *Association of official Agricultural chemists, Washington.*

Maugenet J., 1969. Communication personnelle de travaux en cours.

Mengaud P., 1959. Récupération des alcools pendant la fermentation. *Vignes Vins* (2), 20.

Pavlov G. A., Kischinevsky M. X., Maltabar V. M., 1967. Composition et qualité de l'alcool entraîné par le gaz carbonique pendant la fermentation du moût (en russe). *Vinod. Vinogr.*, **8**, 12-13,

Ulrich R., 1965. Qualité des fruits conservés en atmosphère contrôlée. *Eucardia C* 12 17/7/1965. Lund (Suède).

Webb A. D., Ough C. S., 1962. Comparaison of wines from aroma stripped musts with wines to which aroma was re-added. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **13**, 51-53.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (1), 69-73.

NOTE DE LABORATOIRE

IDENTIFICATION DES ACIDES ORGANIQUES ET ÉVALUATION DE LEURS TENEURS INDIVIDUELLES DANS LES MOÛTS ET LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE ET PHOTODENSITOMÉTRIE

M. BOURZEIX, J. GUITRAUD et F. CHAMPAGNOL
avec la collaboration technique de N. HEREDIA

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Station de Recherches viticoles,
Centre de Recherches de Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

La méthode décrite permet, en une seule opération, d'identifier et de doser les principaux acides organiques non volatils.

I. — SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

A. — *Mode opératoire*

Les couches de cellulose (Macherey und Nagel MN 300) (200 × 200 × 0,75 mm) doivent être d'épaisseur rigoureusement uniforme. Elles sont préparées et stockées dans un local exempt de vapeur acide.

1. *Dépôt des solutions.*

Les solutions à analyser sont déposées en bandes fines de 20 mm de longueur, disposées à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

Les vins blancs sont déposés à raison de 20 microlitres. Les moûts et les jus de raisin, rouges ou blancs, doivent être déposés à la même dose, mais après dilution (moût ou jus : 1 vol.-eau : 3 vol.). Les vins rouges sont débarrassés préalablement des anthocyanes pour éviter leur superposition avec le spot de l'acide tartrique. On les traite avec du charbon végétal à raison de 250 mg/10 ml. On sèche les affusions successives au cours du dépôt par un courant d'air à température ambiante.

2. *Humidification et développement.*

L'enceinte de développement est saturée de vapeur d'eau au moyen de deux béchers de 25 ml (forme basse) dans lesquels on verse une vingtaine de millilitres d'eau à 70°C. Dix minutes après, on introduit deux plaques dans l'enceinte, la couche cellulosique tournée vers les béchers (vers l'intérieur). On referme et après deux heures d'humidification on verse le solvant de développement dans le fond de l'enceinte.

Ce solvant est constitué par la phase supérieure du mélange : butanol-acide formique-eau

(4 v. — 2 v. — 5 v.). Les meilleures séparations sont obtenues avec le mélange préparé depu plusieurs semaines.

On arrête la migration lorsque le front arrive à 2 cm du bord supérieur.

3. *Séchage.*

L'évaporation complète des traces d'acide formique est assurée au bout de deux heures so un courant d'air.

4. *Révélation.*

On utilise le mélange suivant :

— 20 ml d'une solution aqueuse de D. arabinose (2 g dans 20 ml).

— 22 ml d'une solution alcoolique d'aniline (2 ml d'aniline récemment distillée dans 20 d'éthanol).

— 58 ml de *n*-butanol débarrassé de ses impuretés acides par 2 heures d'agitation sur soude (30 g de soude par litre de butanol), puis distillation.

Ce mélange doit être conservé à basse température et à l'abri de la lumière. Il est pulvéri sur les plaques posées horizontalement à raison de 10 à 12 ml sur chacune. Les plaques sont mis dans une étuve à 90°C bien ventilée (il est essentiel que tout l'espace intérieur de l'étuve soit une température rigoureusement uniforme : ± 0°1C) et obscure, pendant 6 minutes, puis ell sont placées dans une enceinte, à l'abri des vapeurs acides.

Le lendemain, la révélation est d'une netteté suffisante.

B. — *Résultats*

Les Rf des taches brunes des différents acides sont les suivants :

Acide tartrique	0,13
Acide citrique	0,23
Acide malique	0,34
Acide citramalique	0,55
Acide lactique	0,69
Acide succinique	0,79

Chacun des acides et ses différents sels sont isolés au sein d'une même tache chromatogr phique.

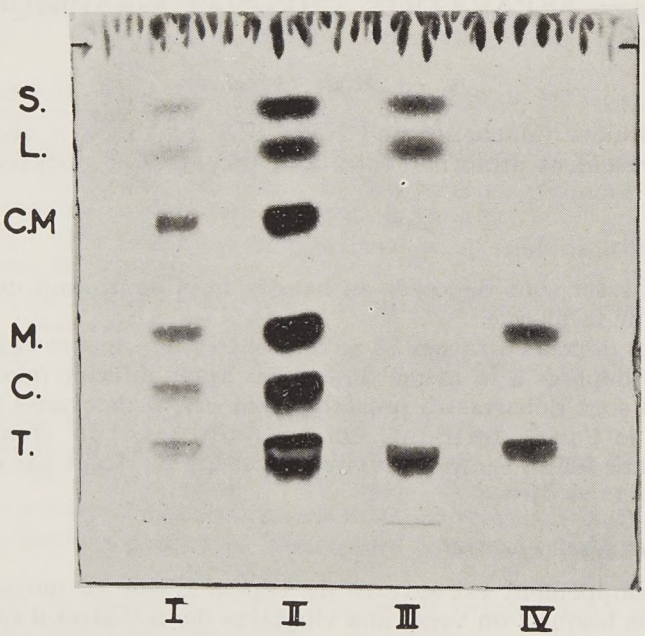


FIG. 1. — *T : Acide tartrique ; C : Acide citrique ; M : Acide malique ; C. M. : Acide citra-malique ; L : Ac lactique ; S : Acide succinique ;*
I : *Solution-Témoin* (10 méq. de chaque acide par litre) II : *Solution-Témoin* (50 méq. de chaq acide par litre) III : *Vin rouge de* Carignan *1967)* IV : *Jus de raisin rouge 1968*

Les acides exogènes utilisés comme antiseptiques autorisés ou frauduleux (acides sulfureux, sorbique, benzoïque, salicylique et leurs sels) n'interfèrent pas.

Les acides naturels présents à l'état de traces (mais généralement absents) ne gênent pas (acides oxalique, alphacétoglutarique, chlorhydrique, cyanhydrique, galacturonique, glycuronique, glutamique, nitrique, phosphorique et leurs principaux sels) soit qu'ils ne migrent pas, soit qu'ils ne sont pas révélés. Trois de ces acides cependant peuvent intervenir : l'acide gluconique (Rf = 0,44) qui n'en chevauche aucun autre, l'acide cétoglutarique (Rf = 0,55) qui interfère avec l'acide citramalique dans les cas très exceptionnels où sa teneur n'est pas négligeable. Enfin dans le cas des vins eudémisés ou issus de vendanges botrytisées, l'acide glycuronique vient accroître l'intensité de la tache d'acide tartrique.

II. — ÉVALUATION PHOTODENSITOMÉTRIQUE

En photodensitométrie, la loi de Beer (proportionnalité de la densité optique d'une substance analysée au nombre de ses molécules traversées) se traduit par la proportionnalité de la surface du pic enregistré (c'est-à-dire l'intégrale de la densité optique des différents points de la tache) à la quantité de la substance responsable de la tache.

Dans le cas présent, la surface des pics se trouve être proportionnelle à la quantité d'acides déposés jusqu'à un microéquivalent. Au-delà de cette dose la courbe n'est plus linéaire.

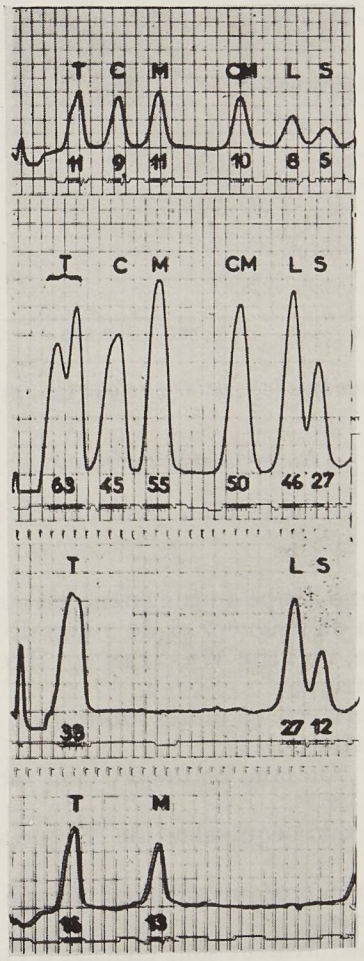


FIG. 2. — I. *Solution témoin* (10 méq de chaque acide par litre) II. *Solution témoin* (50 méq. de chaque acide par litre) III. *Vin rouge de* Carignan *1967* IV. *Jus de raisin rouge 1968*
Le chiffre en dessous de chaque pic cor resp cnd au nombre de « tops »

L'examen de la figure 3 montre que pour un même dépôt tous les acides ne donnent pas le même résultat. C'est le composé obtenu par la révélation de l'acide tartrique qui a le coefficient d'extinction spécifique le plus important, celui obtenu par la révélation de l'acide succinique étant le plus faible.

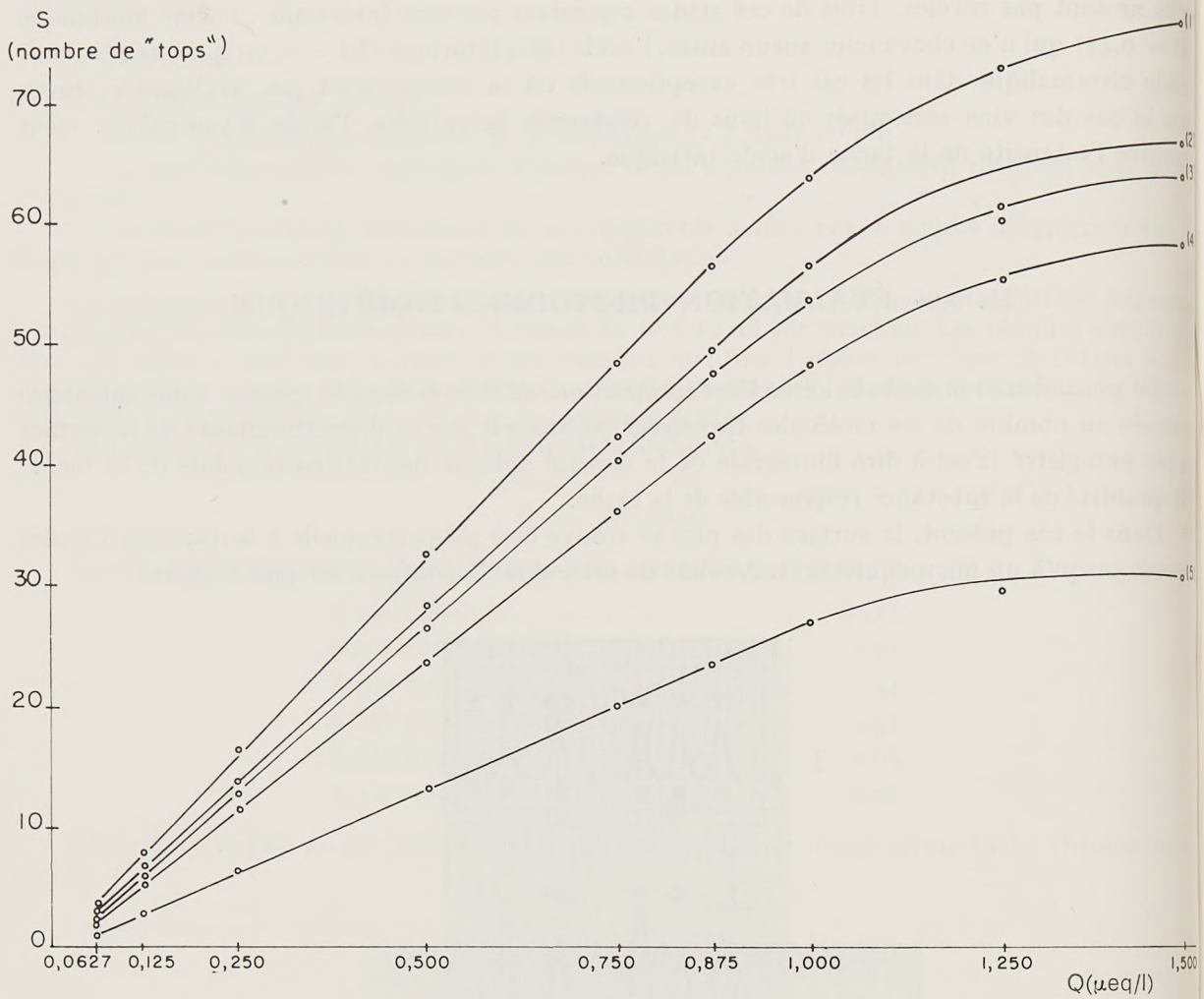


FIG. 3. — *Acide tartrique* (1) ; *acide malique* (2) ; *acide citrique* (3) ; *acide lactique* (4) ; *acide succinique* (5).

A. — *Mode opératoire*

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un photomètre intégrateur enregistreur Vernon type TRD 5.

On opère en « transparence ».

Le faisceau lumineux issu d'une lampe au tungstène est concentré par une lentille plan-cylindrique selon une bande de 21 mm de longueur et de 2 mm de largeur.

Afin d'augmenter le contraste, un filtre WRATTEN (47 B) est placé entre la plaque chromatographique et la cellule photoélectrique.

La surface de chaque pic est intégrée en unités arbitraires, au moyen de *tops* successifs inscrits au bas de la feuille d'enregistrement.

Sur une même plaque 200 × 200 mm, on dépose cinq taches selon une bande de 20 mm de longueur :

— solution synthétique : 0,2 microéquivalent de chaque acide (pour l'acide lactique, on part du lactate de Na) ;
— solution synthétique : 1,0 microéquivalent de chaque acide ;
— trois échantillons à analyser.

Les doses de 0,2 et 1,0 microéquivalent sont choisies à l'intérieur des limites où la détermination photodensitométrique respecte la loi de Beer, permettant ainsi de tracer une droite pour chaque acide. La surface des pics des échantillons à analyser, ramenée à cette droite étalon, permet de déterminer les teneurs en acides.

B. — *Résultats*

1. *Précision.*

L'étude de la précision effectuée dans le cas d'un vin à partir des acides tartrique, lactique et succinique a montré des erreurs relatives (P : 0,05) respectivement inférieures à ± 5,3 p. 100, ± 4,0 p. 100 et ± 4,2 p. 100.

Dans le cas d'un jus, une étude analogue a donné ± 3,9 p. 100 pour l'acide tartrique et ± 3,1 p. 100 pour l'acide malique.

2. *Évolution des taches en fonction du temps.*

Une attente de 15 heures après le chauffage est nécessaire et suffisante. Au-delà, on observe encore une évolution de la teinte des taches vers le brun et aussi une légère augmentation du contraste. Ces évolutions ne modifient pas les résultats des dosages si les mesures sont faites au-delà de l'attente de 15 heures (témoins et échantillons évoluent de même).

3. *Influence éventuelle de la décoloration.*

Les évaluations photodensitométriques réalisées à partir d'un vin blanc chromatographié soit directement, soit après passage sur charbon, montrent que ce traitement n'entraîne pas de perte d'acide.

4. *Influence éventuelle de la salification.*

La surface des pics est la même, pour un même nombre d'équivalents, que l'acide soit libre, partiellement ou totalement salifié.

Reçu pour publication en décembre 1969.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) : *Résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12,4 photos 9 × 5,5 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Technologie agricole.

Le Directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 6-1970

Dépôt légal: 2e trimestre 1970. N° d'impression: 636.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 19 1970 NUMÉRO 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (2), 79-93.

RECHERCHES SUR L'ARÔME DU MUSCAT

I. — Évolution des constituants volatils au cours de la maturation du « Muscat d'Alexandrie »

C. BAYONOVE et R. CORDONNIER

Station de Technologie agricole,
Centre de Recherches de Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Après avoir mis en évidence, dans des conditions expérimentales bien définies, un profil aromatique du cépage Muscat d'Alexandrie, l'observation de l'évolution de ce profil au cours de la maturation du raisin vert jusqu'au raisin surmûri a permis de mettre en évidence l'apparition à la véraison d'un corps F qui croît pendant la maturation, puis décroît.

En associant l'analyse olfactive à l'analyse chromatographique en phase gazeuse, il a été possible de caractériser le pic F comme étant le plus odorant des corps séparés et de l'identifier au linalol.

INTRODUCTION

Si de grands progrès ont été réalisés dans la connaissance des constituants volatils des fruits, il n'en est pas encore de même de ce que l'on sait de leur arôme ; l'arôme étant défini ici comme « l'élément olfactif de la flaveur, c'est-à-dire l'impression perçue par l'organe olfactif au cours de la dégustation » (Le Magnen, 1964).

Pourtant ce qui fait la caractéristique odorante d'un produit est d'un grand intérêt pour le technologue et le nutritioniste.

L'exemple du raisin est significatif : à l'exception du *Vitis Labrusca* dont l'anthranilate de méthyle caractériserait le goût foxé (Power, 1921 ; Sale, Wilson, 1926 ; Stern, Lee, Mc Fadden, 1967), on ne sait rien des corps responsables de l'arôme des autres cépages ayant fait l'objet de recherches, du Muscat en particulier, pourtant très étudié en raison de son arôme caractéristique et puissant.

Le rôle de la fraction terpénique qu'il renferme (Cordonnier, 1956 ; Webb, Kepner, Maggiora, 1966) à côté de quelques soixante autres constituants volatils identifiés (Stevens *et al.*, 1966) est peut-être important, mais encore indéterminé.

Des constituants terpéniques, en effet, ont été aussi mis en évidence, quoique

en quantité beaucoup plus faible, chez le Grenache, cépage sans arôme caractéristique (Stevens, Bomben, Mc Fadden, 1967).

En fait l'approche expérimentale du problème est délicate en raison du nombre de constituants susceptibles d'intervenir et aussi de l'importance du support fixe de ces substances que constitue le produit naturel. Importance qui rend aléatoire la technique qui consiste à reconstituer sur milieu synthétique l'arôme naturel à partir de ses constituants identifiés.

Dans ce travail nous avons tenté de tourner la difficulté en essayant de repérer les corps qui apparaissent en même temps que l'odeur de Muscat au cours de la maturation du fruit, à la fois par chromatographie en phase gazeuse et par l'analyse olfactive des pics isolés pour nous rendre compte de leur puissance odorante.

L'analyse sensorielle en effet peut être un instrument efficace du chimiste dans sa recherche des constituants volatils participant aux arômes.

Ce couplage a ainsi permis de repérer chez plusieurs variétés musquées un composé qui présenterait l'odeur caractéristique de Muscat (Usseglio-Tomasset, 1966) et de mettre en évidence l'importance des constituants carbonylés dans l'arôme de la banane (Hultin, Proctor, 1961).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Matière première*

Le Muscat d'Alexandrie a été choisi en raison de l'intensité de son arôme et de l'intérêt qu'il offre pour la fabrication du jus de raisin et comme cépage de table.

Des échantillons de 2 kg de raisin ont été prélevés au hasard, par fragments de grappe, chaque semaine durant la période du 4 août au 7 octobre 1967, sur une vingtaine de souches d'une parcelle homogène, puis analysés le plus rapidement possible après conservation de quelques heures à 0°.

2. *Extraction des constituants volatils*

Elle a été réalisée, pour chaque prélèvement, sur un lot de raisins égrappés, puis broyés à l'aide d'un homogénéiseur de type Ultra-Turrax. Le milieu à extraire contient donc le jus, la pulpe et les pellicules. Une partie de ce broyat, 50 ml environ, est réservée à l'analyse de l'acidité et des sucres par réfractométrie, le reste est stabilisé par du fluorure de sodium à la dose de 1 g par kg de grains de raisin.

Sept cents grammes de broyat sont introduits dans une colonne de verre de 2 litres (hauteur 70 cm, diamètre 7 cm) munie d'une jaquette de circulation d'eau pour le contrôle de la température et équipée à sa base d'un verre fritté n° 2, destiné à diviser en fines bulles l'azote utilisé comme gaz d'entraînement. Celui-ci est introduit à la partie inférieure du flacon laveur sous le disque fritté et son débit fixé à 200 ml/mn.

L'extraction est réalisée à une température de 25°C environ. Le gaz sort à la partie supérieure du flacon laveur et abandonne les substances entraînées, d'abord dans un premier piège à 0°C où il perd la plus grande partie de son eau, puis dans un deuxième piège à — 80°C où se concentrent les substances plus volatiles.

L'extraction est arrêtée après 24 heures de barbotage, temps après lequel il a été trouvé que le matériel à extraire ne présentait plus aucune odeur de muscat ; celle-ci se retrouve au contraire dans les extraits piégés à froid.

L'opération est répétée avec les mêmes pièges sur un deuxième lot de 700 g de broyat.

On obtient ainsi en définitive les constituants volatils correspondant à 1,4 kg de raisin dans un poids d'extrait aqueux d'environ 2,5 g, donc concentrés 500 à 600 fois par rapport à l'échantillon initial.

Les différents extraits sont conservés dans un congélateur à — 25°C.

3. *Méthodes d'analyse des extraits*

a) *Analyse par chromatographie en phase gazeuse.*

L'appareil utilisé est un Aerograph Hy Fi 600 à ionisation de flamme, équipé d'un programmeur linéaire de température modèle 326 et d'un système de vanne pour introduire les échantillons gazeux. Les analyses sont faites par injection directe d'une part, par aromogramme d'autre part.

L'injection directe : 4 microlitres du liquide piégé à — 80°C sont injectés à l'aide d'une seringue directement sur la colonne chromatographique.

Les aromogrammes : un millilitre de l'extrait piégé à — 80°C est mélangé au contenu du piège à 0°C, le volume total du liquide est ramené à 15 ml avec de l'eau, puis transvasé dans un flacon laveur de 50 ml. Celui-ci est mis 5 minutes à la température de 40°C ; au bout de ce temps, une circulation d'azote est assurée dans le flacon dont la sortie est reliée au système de vanne à gaz de l'appareil. L'atmosphère surmontant le liquide est entraînée par l'azote à l'intérieur de la boucle de mesure pendant une minute exactement. L'injection sur la colonne est alors faite et maintenue 30 secondes. La boucle de mesure est remise après ce temps en liaison avec le circuit extérieur de l'appareil.

Conditions analytiques : dans tous les cas l'analyse est faite sur une colonne de Carbowax 20 M à 10 p. 100 sur chromosorb W 80/100.

La température du four est maintenue 10 minutes à 55°C puis progressivement augmentée jusqu'à 150°C suivant un gradient de 12°C par minute.

Température de l'injecteur : 100° C (plot 30).
Gaz vecteur : azote 25 ml/mn (1,9 bar)
Hydrogène : 25 ml/mn (1,5 bar)
Air : 300 ml/mn.
Sensibilité : range 1 — atténuation 2.
Déroulement du papier sur enregistreur Honneywell : X 1 (2,5 cm en 6 minutes)

b) *Récupération des constituants volatils à la sortie de la colonne de chromatographie.*

L'absence de dispositif de récupération de fractions sur l'appareil oblige, dans une première expérience, à mesurer par enregistrement le temps de rétention du corps à piéger, puis dans une seconde expérience, à supprimer l'arrivée au détecteur et à dévier directement la sortie de colonne hors de l'appareil. La position du corps choisi est donnée alors par le temps de rétention seul. Les fractions ainsi repérées sont, dès leur sortie de la colonne, soit soumises à l'analyse olfactive, soit piégées sur couche mince et chromatographiées.

c) *Analyse par micro-chromatographie en couche mince.*

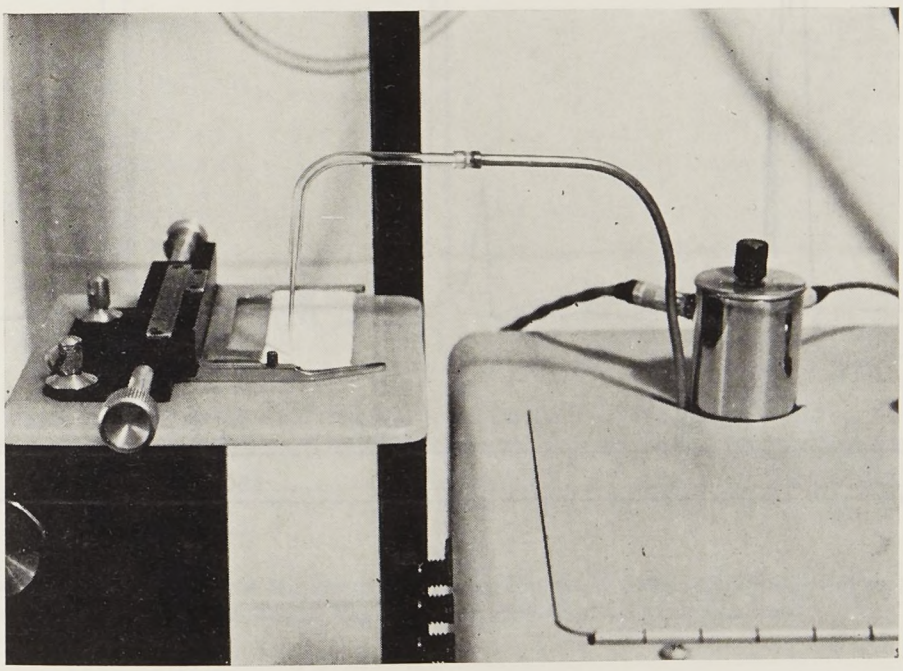


FIG. 1. — *Dispositif de piégeage des fractions sur plaque de Kieselgel G*

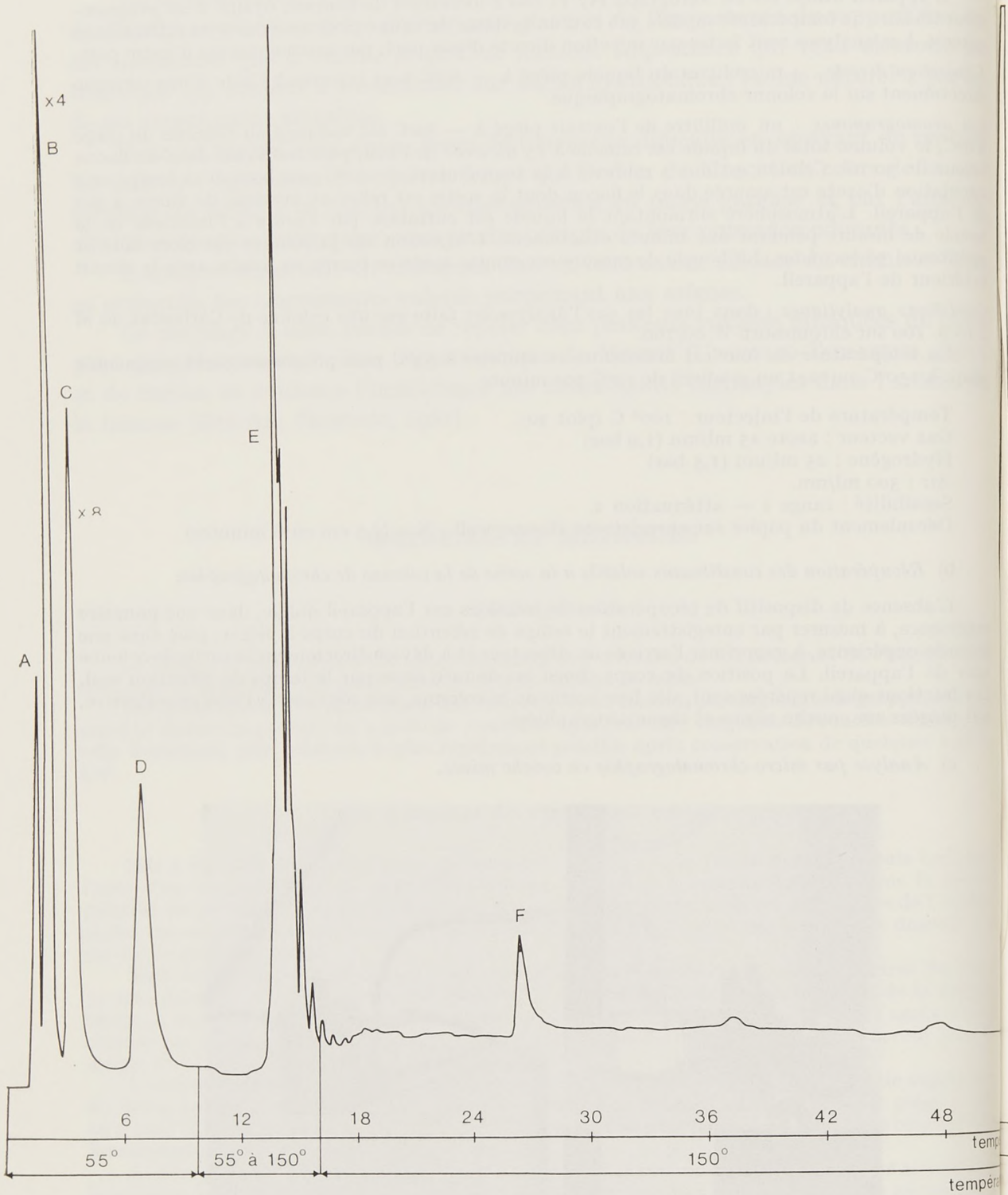


FIG. 2a

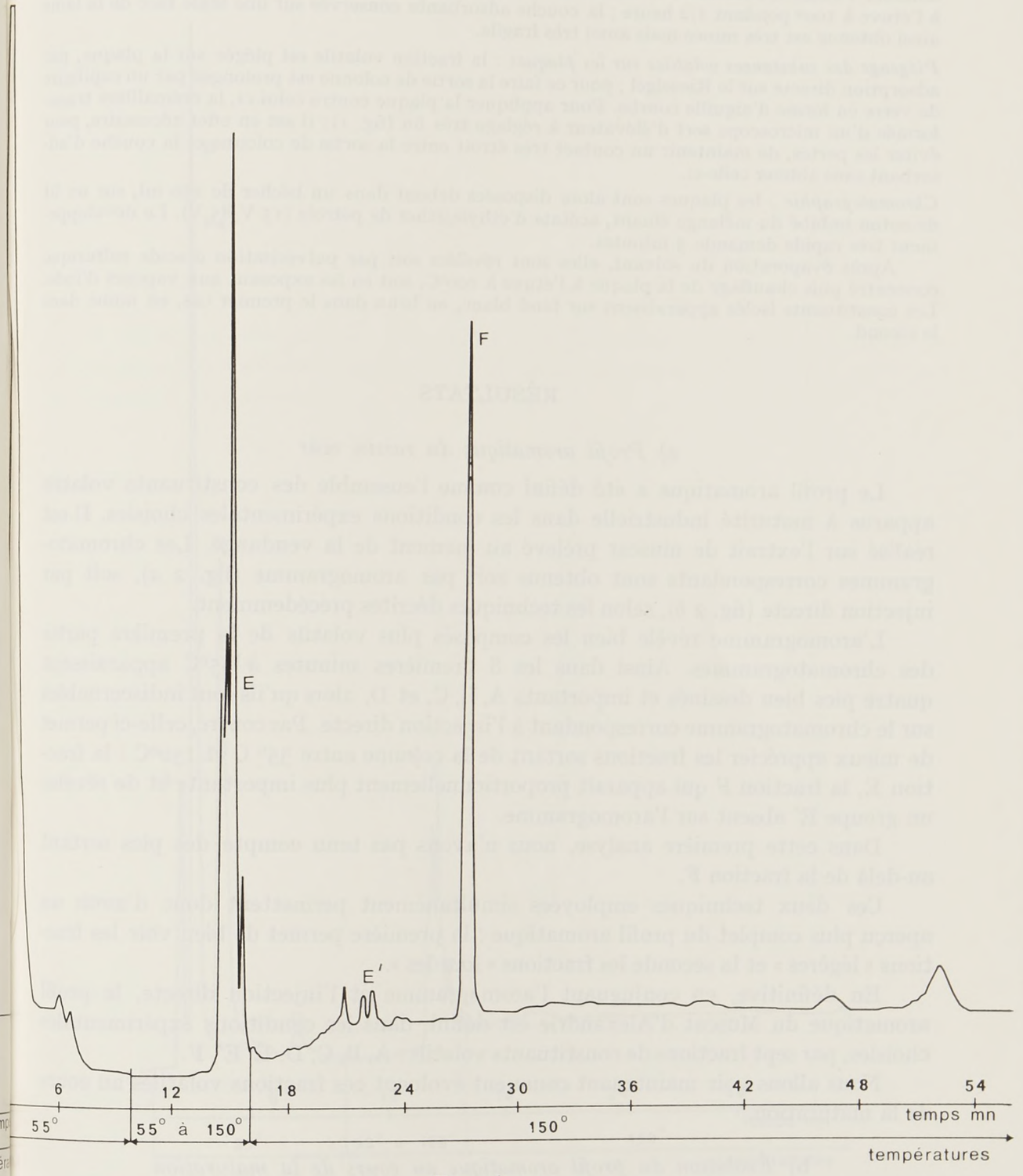


FIG. 2b

FIG. 2. — *Profil aromatique du* Muscat d'Alexandrie *à maturité obtenu par aromogramme* (fig. 2 *a*) *et injection directe* (fig. 2 *b*), *correspondant au* 5e *prélèvement*

Préparation des plaques : des lames de microscope sont utilisées comme support de la couche mince formée par du Kieselgel G d'après STAHL (Merck). Celui-ci (30 g) est mis en suspension dans du méthanol (60 ml). Chaque lame est plongée dans le milieu, égouttée rapidement pour éliminer l'excès d'adsorbant et mise à sécher à l'air, à plat, puis après séchage complet, activée à l'étuve à 100° pendant 1/2 heure ; la couche adsorbante conservée sur une seule face de la lame ainsi obtenue est très mince mais aussi très fragile.

Piégeage des substances volatiles sur les plaques : la fraction volatile est piégée sur la plaque, par adsorption directe sur le Kieselgel ; pour ce faire la sortie de colonne est prolongée par un capillaire de verre en forme d'aiguille courbe. Pour appliquer la plaque contre celui-ci, la crémaillère transformée d'un microscope sert d'élévateur à réglage très fin (fig. 1) ; il est en effet nécessaire, pour éviter les pertes, de maintenir un contact très étroit entre la sortie de colonne et la couche d'adsorbant sans abîmer celle-ci.

Chromatographie : les plaques sont alors disposées debout dans un bécher de 250 ml, sur un lit de coton imbibé du mélange éluant, acétate d'éthyle/éther de pétrole (15 V/85 V). Le développement très rapide demande 5 minutes.

Après évaporation du solvant, elles sont révélées soit par pulvérisation d'acide sulfurique concentré puis chauffage de la plaque à l'étuve à 100°C, soit en les exposant aux vapeurs d'iode. Les constituants isolés apparaissent sur fond blanc, en brun dans le premier cas, en jaune dans le second.

RÉSULTATS

a) *Profil aromatique du raisin mûr*

Le profil aromatique a été défini comme l'ensemble des constituants volatils apparus à maturité industrielle dans les conditions expérimentales choisies. Il est réalisé sur l'extrait de muscat prélevé au moment de la vendange. Les chromatogrammes correspondants sont obtenus soit par aromogramme (fig. 2 *a*), soit par injection directe (fig. 2 *b*), selon les techniques décrites précédemment.

L'aromogramme révèle bien les composés plus volatils de la première partie des chromatogrammes. Ainsi dans les 8 premières minutes à 55°C apparaissent quatre pics bien dessinés et importants A, B, C, et D, alors qu'ils sont indiscernables sur le chromatogramme correspondant à l'injection directe. Par contre, celle-ci permet de mieux apprécier les fractions sortant de la colonne entre 55° C et 150°C : la fraction E, la fraction F qui apparaît proportionnellement plus importante et de révéler un groupe E′ absent sur l'aromogramme.

Dans cette première analyse, nous n'avons pas tenu compte des pics sortant au-delà de la fraction F.

Ces deux techniques employées simultanément permettent donc d'avoir un aperçu plus complet du profil aromatique : la première permet de bien voir les fractions « légères » et la seconde les fractions « lourdes ».

En définitive, en conjuguant l'aromogramme et l'injection directe, le profil aromatique du Muscat d'Alexandrie est défini, dans les conditions expérimentales choisies, par sept fractions de constituants volatils : A, B, C, D, E, E′, F.

Nous allons voir maintenant comment évoluent ces fractions volatiles au cours de la maturation.

b) *Évolution du profil aromatique au cours de la maturation*

La maturation du fruit a été suivie par le dosage des sucres (par réfractométrie), de l'acidité, et par la dégustation de façon à apprécier l'évolution du goût muscat.

Sept prélèvements ont été ainsi faits depuis le raisin vert jusqu'au raisin surmûri.

Ces données analytiques sont rassemblées dans le tableau 1.

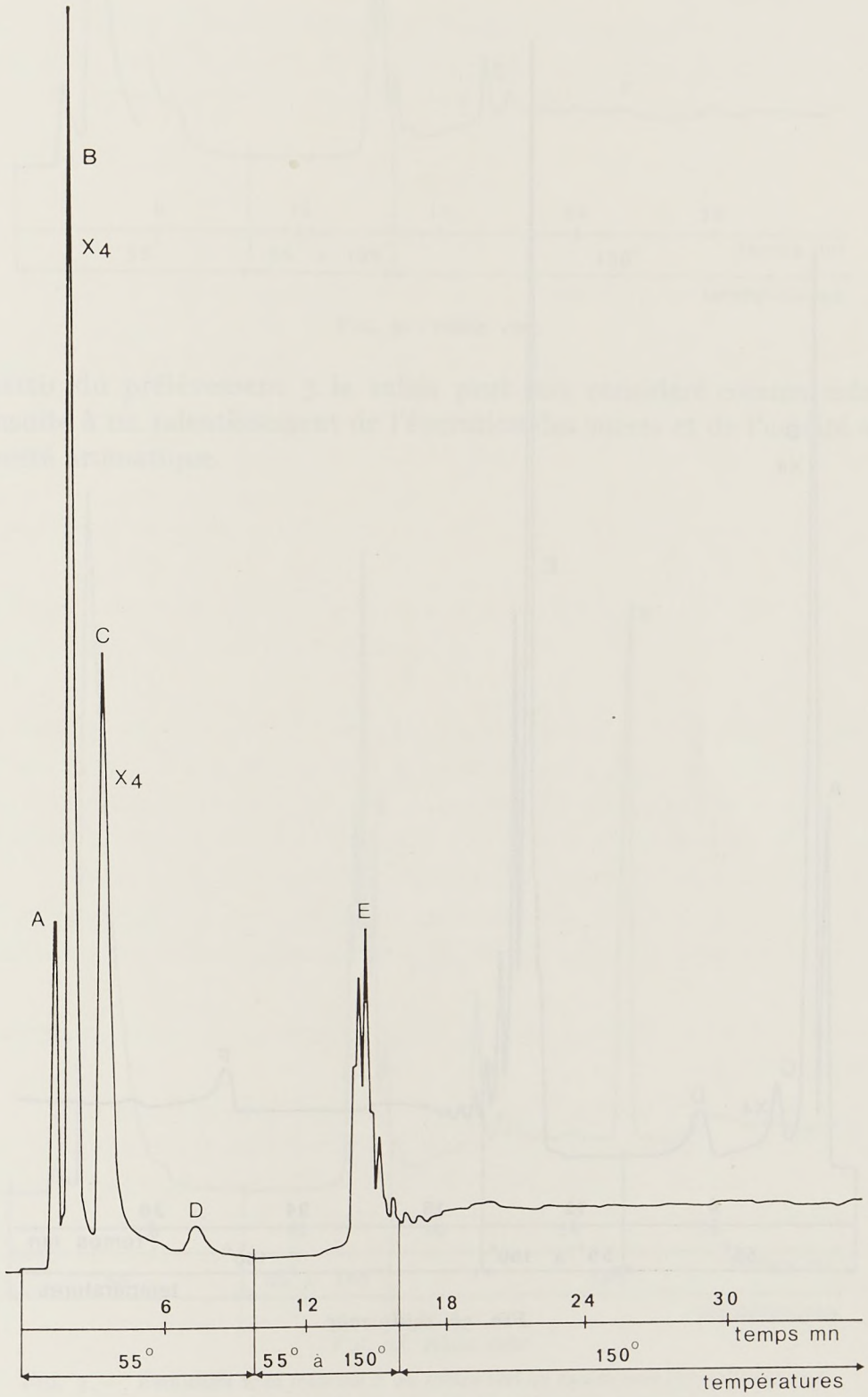


FIG. 3*a* : raisin vert

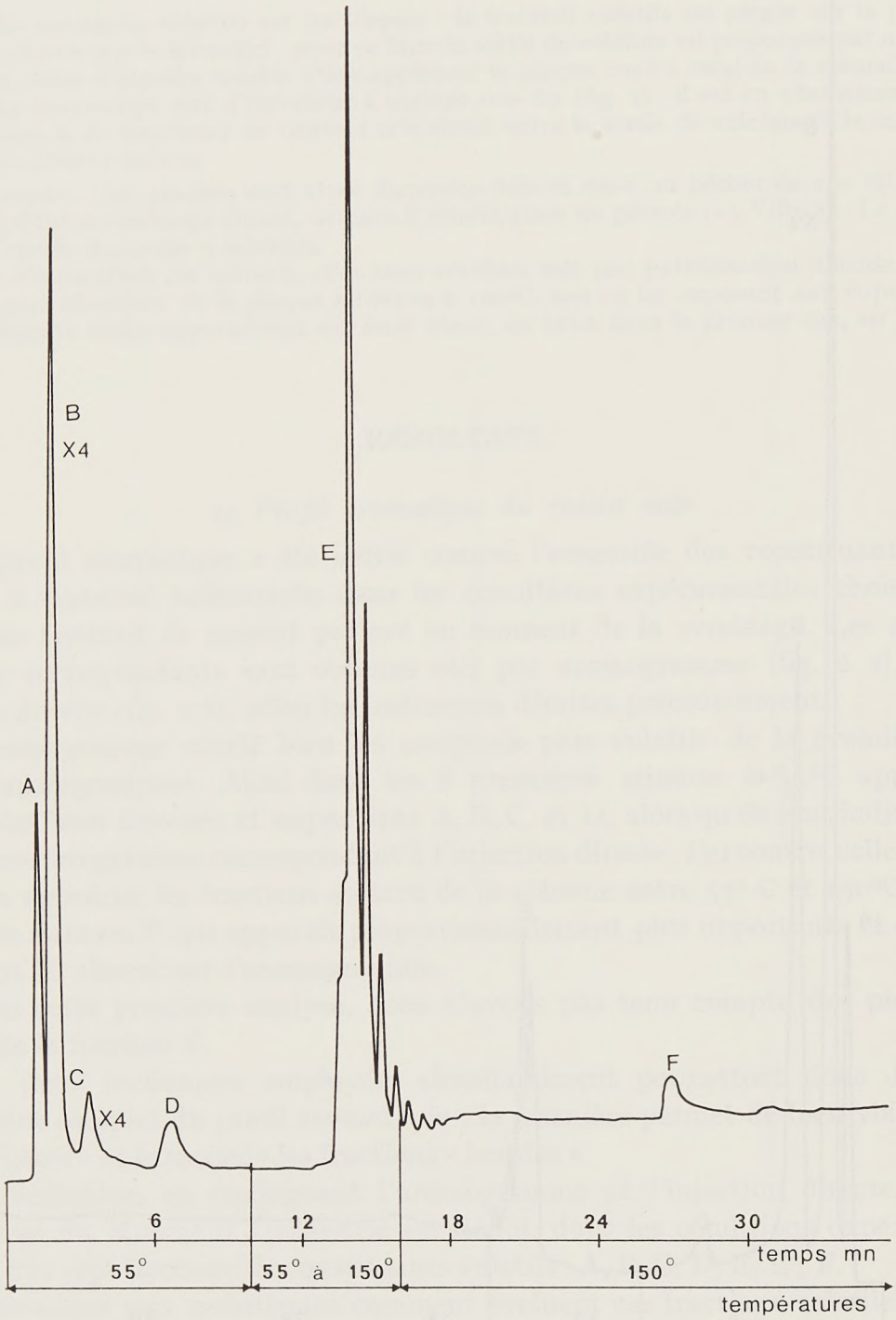


FIG. 3*b*. raisin mûr

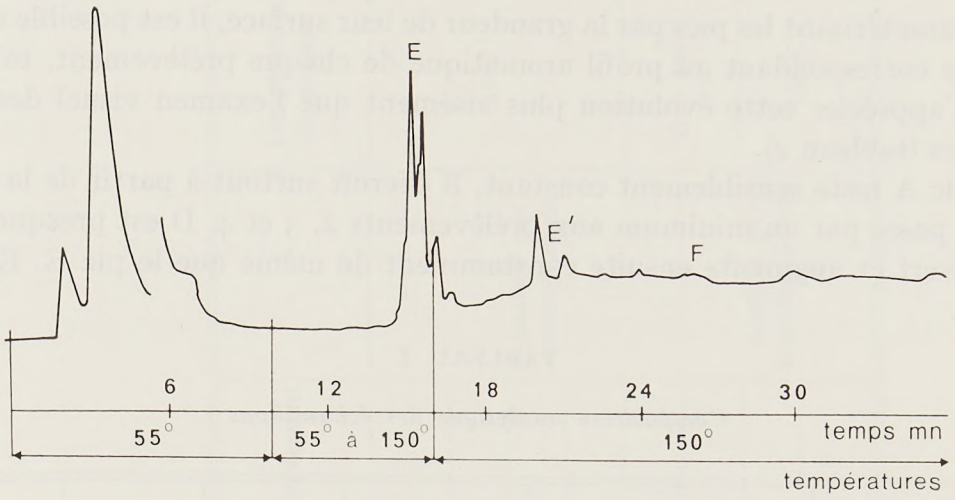


FIG. 3*c* : raisin vert

A partir du prélèvement 3 le raisin peut-être considéré comme mûr car on assiste ensuite à un ralentissement de l'évolution des sucres et de l'acidité ainsi que de l'intensité aromatique.

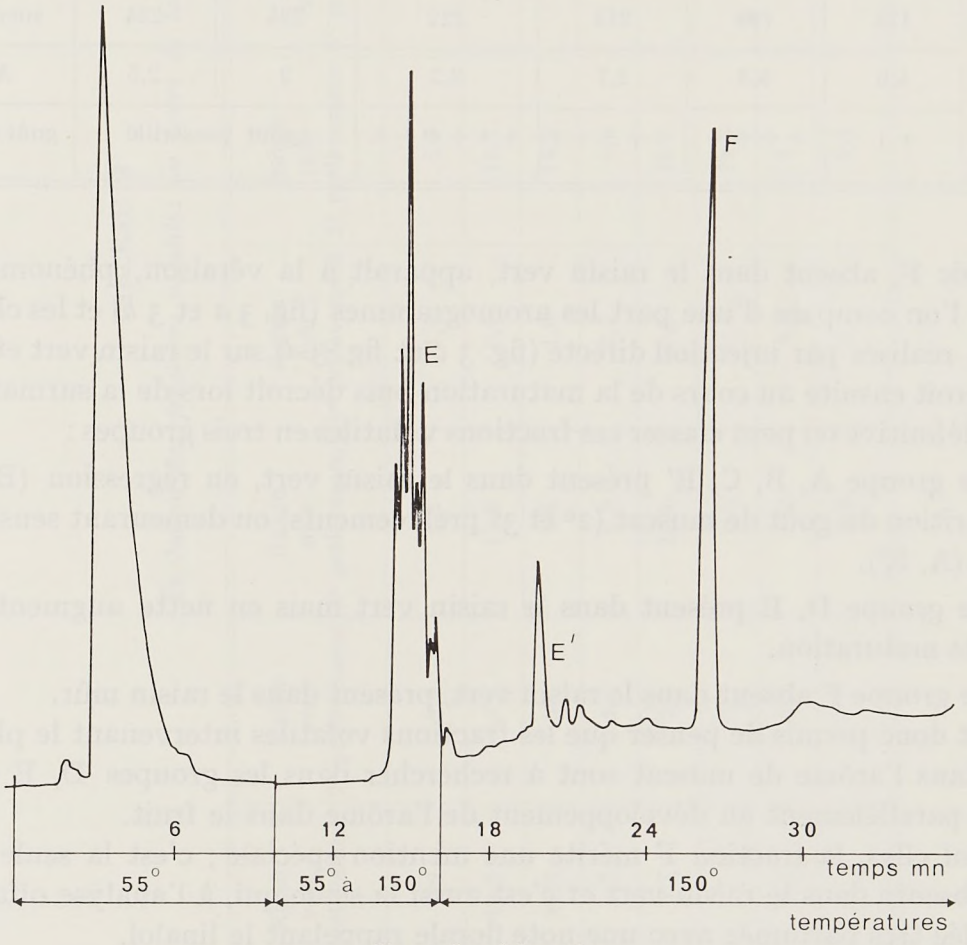


FIG. 3*d*. raisin mûr

FIG. 3 — *Évolution de la fraction F du raisin vert au raisin mûr* (5e prélèvement)
Chromatogrammes réalisés par aromogramme (fig. 3 *a* et 3 *b*) et par injection directe (fig. 3 *c* et 3 *d*)

Tout au long de la maturation les fractions volatiles du profil aromatique, défini par aromogramme et injection directe, subissent une évolution qu'il est intéressant de préciser.

En caractérisant les pics par la grandeur de leur surface, il est possible de dresser le tableau correspondant au profil aromatique de chaque prélèvement, tableau qui permet d'apprécier cette évolution plus aisément que l'examen visuel des chromatogrammes (tableau 2).

Le pic A reste sensiblement constant, B décroît surtout à partir de la surmaturation, C passe par un minimum aux prélèvements 2, 3 et 4. D est presque nul chez le raisin vert et augmente ensuite constamment de même que le pic E. E′ est plus fluctuant.

TABLEAU I

Composition analytique des échantillons

Raisin vert 1er prèlev.	Raisin véré 2e prélèv.	Raisin mûr 3e prélèv.	Raisin mûr 4e prélèv.	Raisin mûr 5e prélèv.	Raisin surmûri 6e prélèv.	Raisin surmûri 7e prélèv.	Prélèvements
89	175	190	213	222	224	224	sucre en g/l
10,8	4,6	3,3	2,7	2,2	2	2,5	Acidité
0	++	++++	+++++	+++++++	goût passerillé		goût de muscat

Le pic F, absent dans le raisin vert, apparaît à la véraison, phénomène bien visible si l'on compare d'une part les aromogrammes (fig. 3 *a* et 3 *b*) et les chromatogrammes réalisés par injection directe (fig. 3 *c* et fig. 3 *d*) sur le raisin vert et le raisin mûr. Il croît ensuite au cours de la maturation puis décroît lors de la surmaturation.

En définitive on peut classer ces fractions volatiles en trois groupes :

— le groupe A, B, C, E′ présent dans le raisin vert, en régression (B, C) lors de l'apparition du goût de muscat (2e et 3e prélèvements) ou demeurant sensiblement constant (A, E′).

— le groupe D, E présent dans le raisin vert mais en nette augmentation au cours de la maturation.

— le groupe F absent dans le raisin vert, présent dans le raisin mûr.

Il est donc permis de penser que les fractions volatiles intervenant le plus directement dans l'arôme de muscat sont à rechercher dans les groupes D, E et F qui évoluent parallèlement au développement de l'arôme dans le fruit.

Parmi elles, la fraction F mérite une mention spéciale ; c'est la seule en effet qui est absente dans le raisin vert et c'est aussi la seule qui, à l'analyse olfactive, se soit révélée très parfumée avec une note florale rappelant le linalol.

c) *Identification de la fraction F*

La fraction F mise en évidence par chromatographie sur colonne de Carbowax 20 M, se retrouve sous forme d'un seul pic après chromatographie sur deux autres phases : Apiézon L et Porapak Q.

TABLEAU 2

Évolution des fractions volatiles au cours de la maturation

Surface des pics	Raisin vert 1er prélèvement	Raisin véré 2e prélèvement	Raisin mûr 3e prélèvement	Raisin mûr 4e prélèvement	Raisin mûr 5e prélèvement	Raisin surmûri 6e prélèvement	7e prélèvement		Température de passage
A	1,9	2,5	2	1,4	2,7	2,6			
B	18,3	13	13,5	9,4	11,6	1,7			
C	11,2	3	1,8	1,8	14,9	22,5		Analyse par chromogramme	55°C
D	0,7	1,5	0,9	2,7	4,5	6,6			
Groupe E	3,7	7,2	12,1	13,5	16	24,4			
Groupe E	3	3,7	8,5	10,1	11,4	14,5			55 à 150°C
Groupe E′	0,5	0,3	1,2	0,4	1	1,1		Analyse par injection directe	
F	0	1	3,9	3,2	6,1	5,5	2,9		150°C

De plus, en mélangeant du linalol pur dans un des extraits correspondant au raisin mûr, un seul pic, agrandi par rapport au témoin, apparaît lors de l'analyse sur les trois types précédents de colonne.

Recueilli sur plaque chromatographique en couche mince, elle donne après migration, une tache qui a le même Rf que le linalol pris comme témoin. Cette tache, révélée à l'acide sulfurique, est brune et fluorescente aux UV, comme le linalol. Si la plaque est soumise aux vapeurs d'iode, la tache apparaît jaune.

La fraction F renferme donc un seul constituant qui se cmpoorte comme le linalol aussi bien en chromatographie sur plaque qu'en chromatographie en phase gazeuse.

DISCUSSION — CONCLUSION

Le profil aromatique du Muscat d'Alexandrie défini dans ce travail par sept fractions est un reflet assez sommaire de la réalité puisqu'en fait plus de soixante constituants volatils ont été identifiés dans ce cépage (Stevens *et al.*, 1966).

Cela tient au faible pouvoir de résolution et au manque de sensibilité de l'équipement analytique utilisé. Certains des résultats obtenus méritent cependant d'être soulignés.

En 1956, l'un de nous (Cordonnier, 1956) mettait en évidence la présence de linalol dans les extraits de différents muscats, celle-ci était confirmée dix ans plus tard dans le Muscat d'Alexandrie (Stevens *et al.*, 1966, Webb, Kepner, Maggiora, 1966). Nous l'avons également retrouvé dans ce cépage, mais le fait nouveau est que nos résultats paraissent bien montrer qu'il participe de façon prépondérante à l'arôme de ce muscat.

En effet, absent dans le raisin vert, il apparaît à la véraison en même temps que le goût de muscat et il augmente en quantité jusqu'à maturité pour décroître à la surmaturation au cours de laquelle on observe une évolution du goût du raisin.

De plus, l'analyse olfactive des fractions isolées nous a montré que le pic qui lui correspond était très aromatique.

La participation des autres fractions à l'arôme reste au contraire à déterminer. Certaines cependant (les fractions D et E) paraissent plus directement concernées car elles évoluent parallèlement au développement du parfum du fruit mais nous ne savons pas le nombre de corps qu'elles renferment et nous n'avons pas réussi non plus à le déceler par l'analyse olfactive.

Ainsi le fait d'avoir saisi olfactivement uniquement le linalol parmi tous les constituants que renferme le muscat est un indice de plus de l'importance qu'il joue dans l'arôme de ce cépage.

Si nous examinons l'évolution de ces fractions au cours de la maturation nous voyons qu'elles subissent un remaniement profond.

C'est dire combien il est important de préciser l'état de maturité d'un cépage si on veut définir son profil aromatique par rapport à d'autres et combien une analyse plus fine et l'identification des constituants isolés seraient intéressantes comme l'ont déjà montré divers travaux sur la Pomme (Paillard, 1967), la Poire (Phan, 1968), la Banane (Hultin, Proctor, 1961).

En ce qui concerne le linalol, si nous comparons son évolution à celle des sucres et de l'acidité (fig. 4), nous constatons qu'il a atteint, comme l'indice des substances volatiles oxydables (DEIBNER, MOURGUES, CABIBEL-HUGUES, 1965), un maximum avant l'accumulation totale des sucres pour décroître ensuite au moment de la surmaturation.

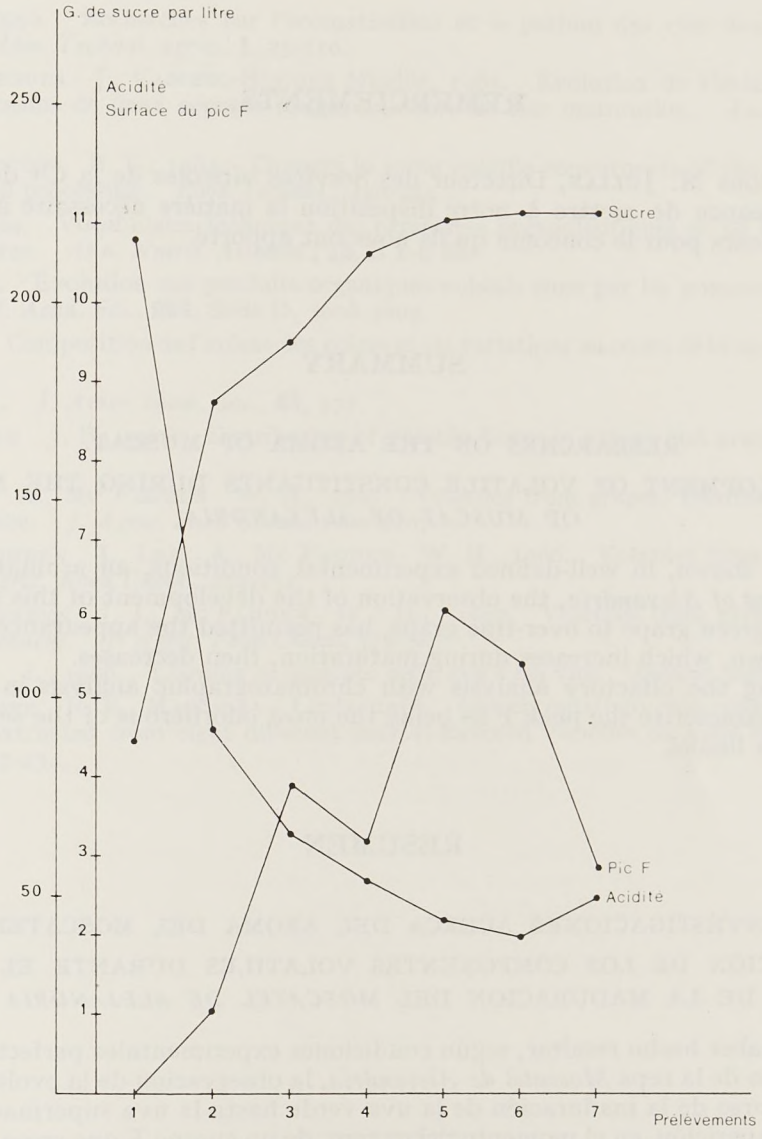


FIG. 4. — *Évolution du linalol, du sucre et de l'acidité au cours de la maturation*

Autrement dit, le maximum d'arôme n'est pas atteint forcément lorsque le fruit atteint sa teneur maximale en sucre. Ceci montre l'insuffisance des critères de maturité faisant intervenir les seuls dosages du sucre et de l'acidité et l'intérêt de la chromatographie en phase gazeuse en tant qu'instrument d'estimation objective de l'arôme.

Jusqu'ici peu de travaux ont été réalisés sur le raisin dans le but d'apprécier l'évolution de son arôme aux différentes étapes de la maturation sinon globalement par le dosage de l'indice des substances volatiles oxydables (DEIBNER, MOURGUES, CABIBEL-HUGUES, 1965).

Mais ce test n'offre qu'un intérêt assez limité pour ce qui concerne l'estimation de l'arôme d'un fruit puisqu'il se trouve que, parmi les cépages étudiés, les plus

parfumés présentent un indice d'arôme plus faible que les cépages sans parfum (cité par DEIBNER, MOURGUES, CABIBEL-HUGUES, 1965) et qu'il suffit d'un début de fermentation intracellulaire pour que l'éthanol formé, sans action sur la spécificité de l'arôme, multiplie par deux ou trois sa teneur en constituants volatils totaux (HULTIN, PROCTOR, 1961).

Reçu pour publication en mai 1969.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. JULIAN, Directeur des Services viticoles de la Cie des Salins du Midi, d'avoir eu l'obligeance de mettre à notre disposition la matière nécessaire à cette étude ainsi que ses collaborateurs pour le concours qu'ils nous ont apporté.

SUMMARY

RESEARCHES ON THE AROMA OF MUSCAT.

I. — DEVELOPMENT OF VOLATILE CONSTITUANTS DURING THE MATURATION OF *MUSCAT OF ALEXANDRIA*

After having shown, in well-defined experimental conditions, an aromatic section of the wine-plant, *Muscat of Alexandria*, the observation of the development of this section during the maturation from green grape to over-ripe grape, has permitted the appearance, at ripening, of a body F to be shown, which increases during maturation, then decreases.

By associating the olfactory analysis with chromatographic analysis in gazeous phase, it was possible to characterize the peak F as being the most odoriferous of the separate bodies and to identify it with linalol.

RESUMEN

INVESTIGACIONES ACERCA DEL AROMA DEL MOSCATEL

I. — EVOLUCION DE LOS COMPONENTES VOLATILES DURANTE EL TRANSCURSO DE LA MADURACION DEL *MOSCATEL DE ALEJANDRIA*

Después de haber hecho resaltar, según condiciones experimentales perfectamente definidas, un perfil aromático de la cepa *Moscatel de Alejandría*, la observación de la evolución de este perfil durante el transcurso de la maduración de la uva verde hasta la uva supermadura ha permitido hacer resaltar la aparición, en el momento del envero, de un cuerpo F que crece durante la maduración y, acto seguido, decrece.

Combinando el análisis olfactivo con el análisis cromatográfico en fase gaseosa, se ha podido caracterizar la punta F como aquella más odorante de los cuerpos separados y su identificación con el linalol.

RIASSUNTO

RICERCA SULL'AROMA DEL MOSCATO

I. — EVOLUZIONE DEI COSTITUENTI VOLATILI DURANTE LA MATURAZIONE DEL *MOSCATO D'ALESSANDRIA*

Dopo aver masso in evidenza, in condizioni sperimentali ben definite, un profilo aromatico del vitigno *Moscato d'Alessandria*, l'osservazione dell'evoluzione di questo profilo durante la maturazione dell'uva verde fino all'uva sovrammatura, ha permesso di rilevare all'invaiatura un corpo F che cresce durante la maturazione, poi decresce.

Associando l'analisi olfattiva a quella cromatografica in fase gassosa, è stato possibile caratterizzare la cresta F come il più odoroso dei corpi separati e di identificarlo al linalolo.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CORDONNIER R., 1956. Recherches sur l'aromatisation et le parfum des vins doux naturels et des vins de liqueur. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 75-110.

DEIBNER L., MOURGUES J., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1965. Évolution de l'indice des substances aromatiques des raisins de deux cépages rouges au cours de leur maturation. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 5-14.

HULTIN H. O., PROCTOR B. E., 1961. Changes in some volatile constituents of the banana during ripening, storage and processing. *Food Technol.*, 440-444.

LE MAGNEN J., 1964. Vocabulaire technique des caractères organoleptiques et de la dégustation des produits alimentaires. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **18**, B 1-B 86.

PAILLARD N., 1967. Évolution des produits organiques volatils émis par les pommes au cours de leur maturation. *C. R. Acad. Sci.*, **264**, Série D, 3006-3009.

PHAN C. T., 1968. Composition de l'arôme des poires et ses variations au cours de la maturation. *Fruits* **23**, 423-430.

POWER F. B., 1921. *J. Amer. chem. Soc.*, **43**, 377.

SALE J. W., WILSON J. B., 1926. Distribution of volatile flavor in grapes and grape juice. *J. agric. Res.*, **33**, 301-310.

STERN D. J., LEE A., MC FADDEN W. H., 1967. Volatiles from grapes. Identification of volatiles from *Concord* essence. *J. Agric. Food Chem.*, 1100-1107.

STEVENS K. L., BOMBEN J., LEE A., MC FADDEN W. H., 1966. Volatiles from grapes *Muscat of Alexandrie*. *J. Agric. Food Chem.*, 249-252.

STEVENS K. L., BOMBEN J. L., MC FADDEN W. H., 1967. Volatiles from grapes. - *Vitis vinifera* (LINN) cultivar *Grenache*. *J. Agric. Food Chem.*, 378-385.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1966. L'aroma di moscato nelle uve e nei vini. *Industr. agrar.*, **4**, 3-31.

WEBB A. D., KEPNER R. E., MAGGIORA Linda, 1966. Gas chromatographic comparison of volatile aroma materials extracted from eight different muscat-flavored varieties of *Vitis vinifera*. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **17**, 247-254.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (2), 95-105.

RECHERCHES SUR L'ARÔME DU MUSCAT

II. — Profils aromatiques de cépages muscat et non muscat. Importance du linalol chez les muscats.

C. BAYONOVE et R. CORDONNIER

Station de Technologie végétale,
Centre de Recherches de Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

La comparaison des profils aromatiques de différents cépages muscat et non muscat a permis de mettre en évidence un certain nombre de constituants volatils qui distinguent les premiers des seconds.

Parmi ces constituants le linalol revêt une importance particulière : il est présent chez tous les muscats étudiés (Alexandrie, Hambourg, Frontignan, Ottonel, Fleur d'Oranger, Reine des Vignes) et en proportion importante par rapport aux autres constituants.

Le linalol subit une évolution identique au cours de la maturation chez les muscats d'Alexandrie, Hambourg et Frontignan.

INTRODUCTION

Dans une communication précédente (Bayonove, Cordonnier, 1970), nous avons montré l'importance du rôle du linalol dans le parfum du Muscat d'Alexandrie : ce corps apparaît en effet à la véraison en même temps que le goût de muscat ; il est de plus très aromatique et parmi les fractions isolées il a été le seul décelé par l'analyse olfactive dans les conditions expérimentales choisies.

Cette étude a été étendue à d'autres variétés de muscat et leur profil aromatique a été comparé à celui de variétés non muscat dans le but de nous rendre compte si la présence de linalol était bien une constante des cépages muscats.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *La matière première*

Les variétés étudiées ont été les suivantes :

Muscats de Frontignan, Hambourg, Fleur d'Oranger, Ottonel, Reine des Vignes, Alexandrie ainsi que le Cabernet-Sauvignon, la Syrah, le Merlot, le Piquepoul noir et le Chasselas.

Des échantillons de 1 kg de raisins ont été prélevés par fragments de grappes sur une vingtaine de souches de parcelles homogènes, puis traités le plus rapidement possible après conservation de quelques heures à 0°C.

Les prélèvements ont été réalisés à trois stades différents de maturité : vert, véré, mûr, pour l'étude de la maturation, et à maturité industrielle, c'est à dire au moment de la récolte de la parcelle, pour l'étude des profils aromatiques.

2. *Extraction des constituants volatils*

Elle a été réalisée, suivant les conditions expérimentales précédemment décrites (Bayonove, Cordonnier, 1970), par entraînement à l'azote des constituants volatils. Ceux-ci sont récupérés dans des pièges froids sous forme d'extraits aqueux qui sont conservés dans un congélateur à — 25°C.

3. *Analyse des extraits par chromatographie en phase gazeuse*

Dans tous les cas, l'analyse a été faite par injection directe de 2 microlitres d'extraits sur colonne de Carbowax 20 M à 10 p. 100 sur chromosorb W 80/100 et la chromatographie réalisée dans les conditions choisies et avec l'appareillage utilisé précédemment (Bayonove, Cordonnier, 1970).

Toutefois la vitesse d'enregistrement des pics a été portée de 2,5 à 10 cm/6 minutes dans la partie des chromatogrammes correspondant à un ensemble de petits pics (A, B, C, D) difficiles à mesurer à vitesse plus lente.

Avant l'analyse on introduit dans chaque extrait 10 microlitres d'une solution aqueuse de phénol à 4 p. 100 ce qui correspond à une concentration de l'ordre de 300 à 350 µg par ml, suivant le volume des extraits.

Cet étalon interne permet de faire le rapport des surfaces des différents pics à celle du pic du phénol et d'obtenir des données directement comparables d'un échantillon à l'autre d'où sont éliminés les écarts dus aux différences de volume soit des extraits entre eux soit des prises d'échantillons injectés sur la colonne.

Le phénol a été choisi car il apparaît sous forme d'un pic bien isolé en fin des chromatogrammes.

4. *Dosage du linalol*

Les quantités de linalol présentes dans les extraits ont été estimées en comparant la surface des pics de linalol correspondant aux extraits à celles données par des courbes de référence obtenues à partir de solutions pures de linalol dans l'éthanol.

Ces courbes ont été réalisées, dans les domaines de sensibilité utilisée pour l'analyse des échantillons, par injection directe de 2 µl de solutions de linalol aux concentrations suivantes :

12 à 144 µg/ml.....	atténuation 2
48 à 336 µg/ml.....	atténuation 4
192 à 600 µg/ml.....	atténuation 8

Les résultats sont exprimés en µg de linalol par kg de raisin.

RÉSULTATS

Profil aromatique des raisins mûrs

Il est réalisé par injection directe des extraits de raisins prélevés au moment de la vendange. L'injection directe permet en effet d'apprécier mieux que l'aromogramme les fractions volatiles sortant de la colonne à partir de 150°C (BAYONOVE, CORDONNIER, 1970), le linalol, en particulier, objet de ce travail.

La figure 1 donne un exemple des profils aromatiques ainsi obtenus sur un cépage muscat (le muscat Fleur d'Oranger) et non muscat (le Cabernet-Sauvignon).

Dans ces deux profils on distingue nettement deux parties : *a*) la première comprend un groupe de fractions sortant de la colonne dans les dix premières minutes à 55°C et les huit suivantes entre 55° et 150°C. Elle renferme un nombre indéterminé de constituants, lesquels auraient été sans doute mieux séparés par la technique de l'aromogramme ; elle correspond à la fraction « légère », (BAYONOVE, CORDONNIER, 1970) ; *b*) la seconde, la fraction « lourde », comprend un certain nombre de pics bien isolés sortant de la colonne à partir de 150°C : A, B, C, D, E, L, F, G, H.

Parmi eux, le pic L a été identifié comme étant du linalol par les techniques précédemment décrites.

Dans la suite de cet exposé nous retiendrons donc seulement la fraction « lourde » c'est à dire les constituants volatils sortant de la colonne à partir de 150°C.

Au-delà du pic H sortent encore deux pics qui correspondent : le premier à un artefact et le second au phénol utilisé comme marqueur.

Le profil aromatique du muscat Fleur d'Oranger se distingue de celui du Cabernet-Sauvignon par un plus grand nombre de constituants volatils dans la seconde partie du chromatogramme au-delà du pic D et notamment par la présence de linalol, absent du profil aromatique du Cabernet-Sauvignon.

Nous verrons plus loin que ces différences se retrouvent chez tous les cépages muscat et non muscat étudiés.

Évolution des constituants volatils du muscat au cours de la maturation

Chez le Muscat de Hambourg, le raisin vert est très pauvre en constituants volatils, ceux-ci apparaissent en nombre au début de la véraison puis augmentent ensuite quantitativement (fig. 2).

Le linalol, pic L, subit une évolution particulièrement nette : absent chez le raisin vert, il apparaît à la véraison et représente la fraction volatile la plus importante du raisin mûr.

On observe une même évolution qualitative et quantitative chez le Muscat d'Alexandrie et de Frontignan. Au cours de la maturation, des pics nouveaux apparaissent, et la somme des constituants volatils augmente considérablement du raisin vert au raisin mûr. De plus, le linalol apparaît très tôt en début de véraison alors que le raisin est très acide et pauvre en sucre (tabl. 1).

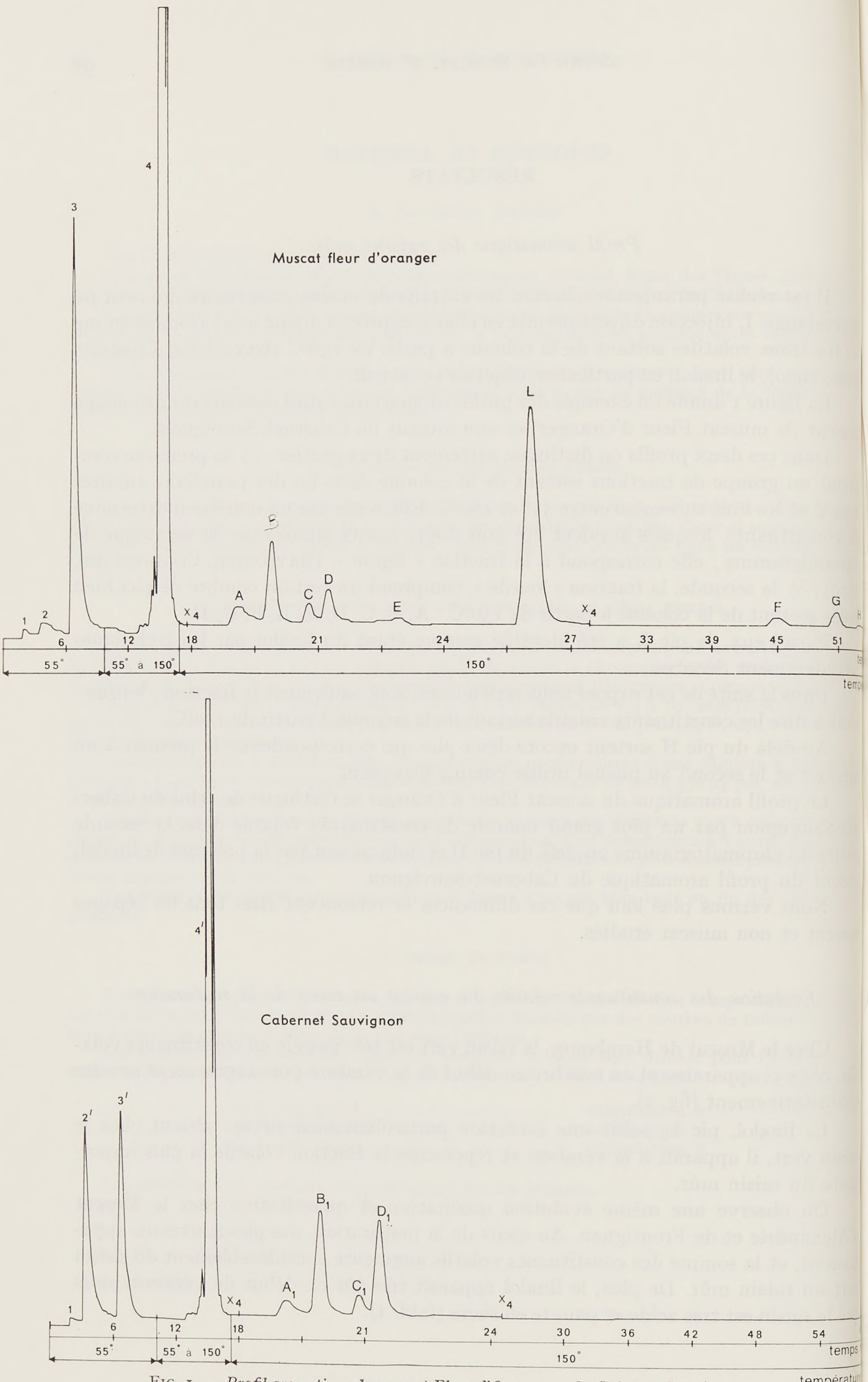


FIG. 1. — *Profil aromatique du muscat Fleur d'Oranger et du Cabernet Sauvignon.*

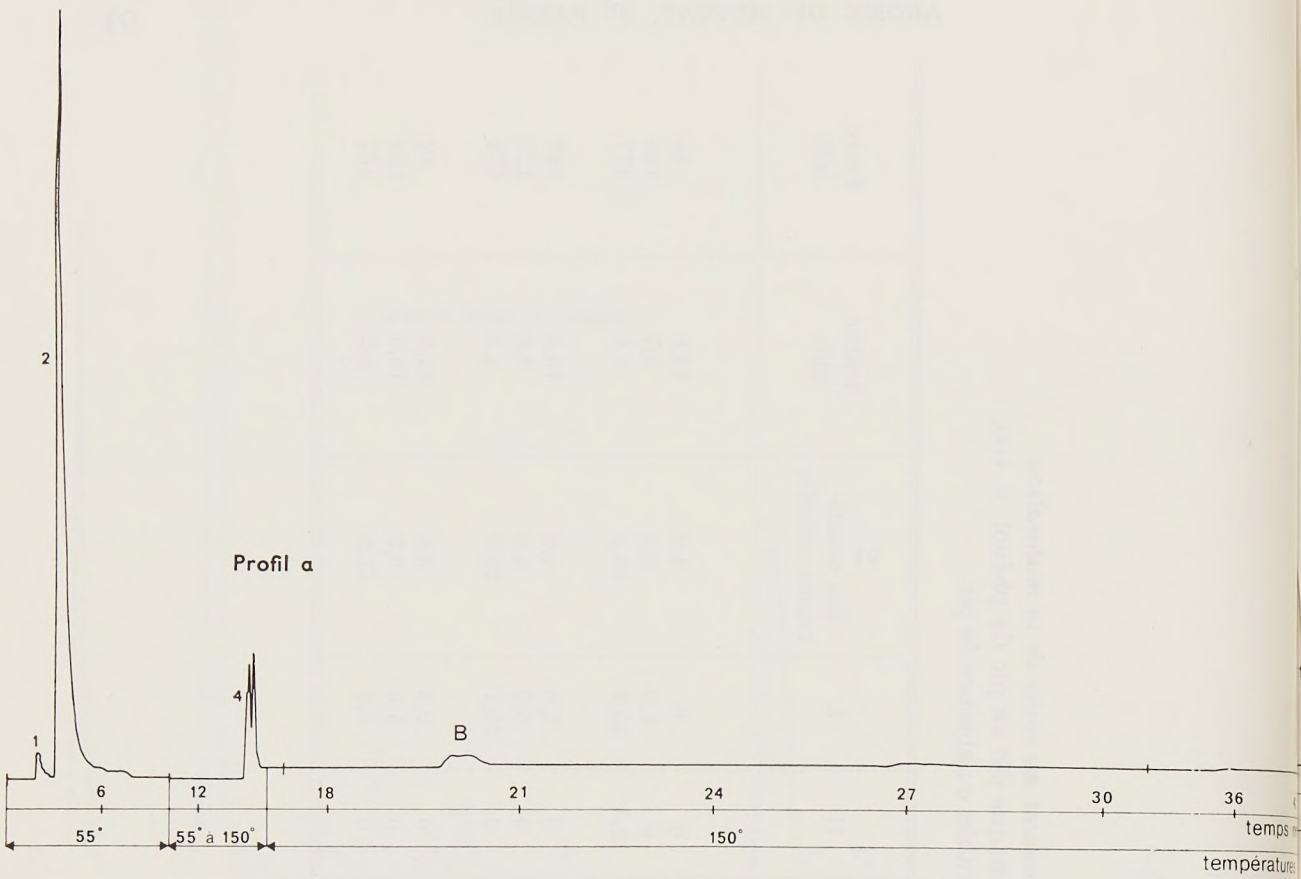
TABLEAU I

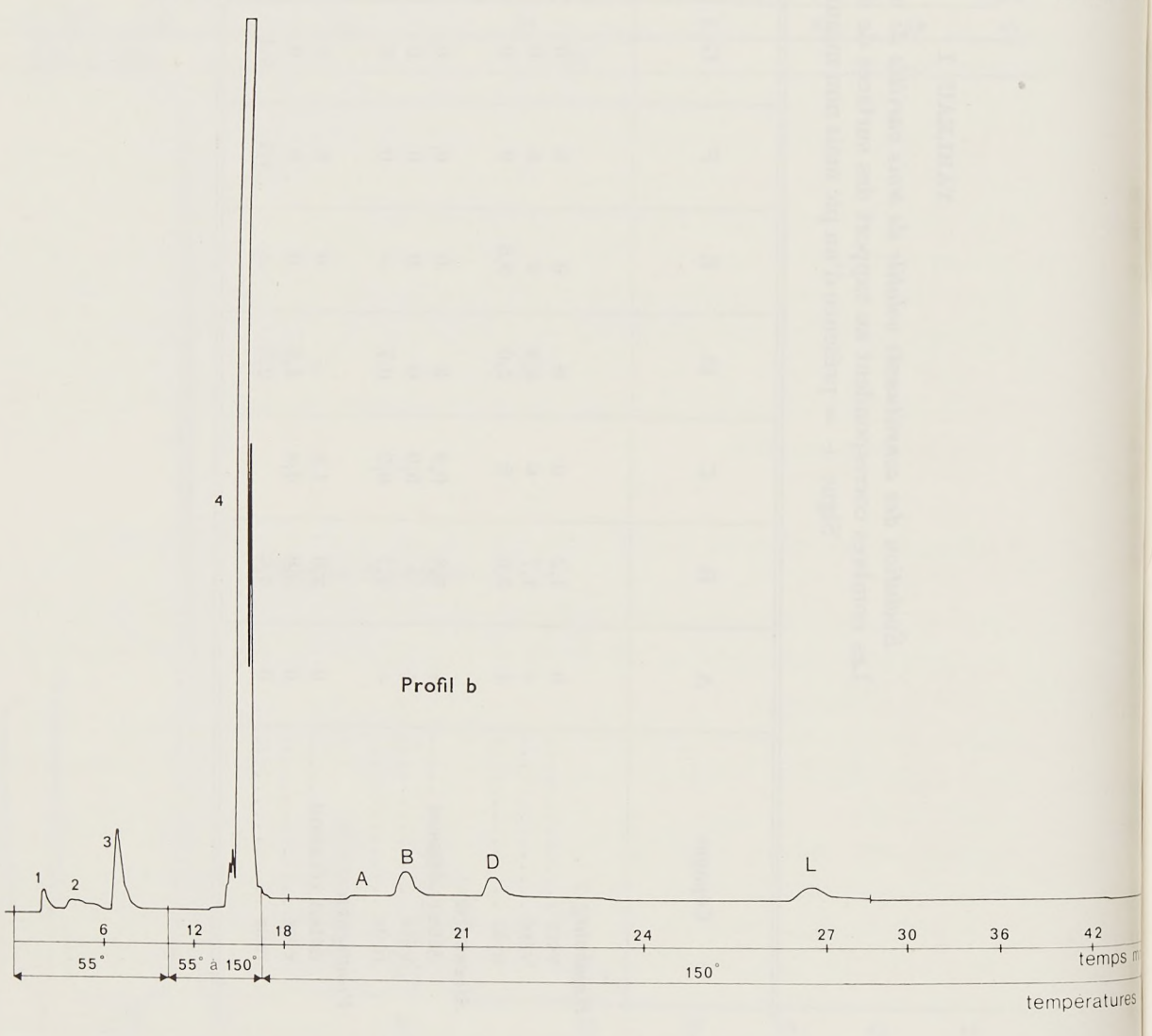
Évolution des constituants volatils de trois variétés de muscat au cours de la maturation

Les nombres correspondent au rapport des surfaces de chaque pic au pic du phénol × 100.

Signe + = présence d'un pic mais non mesurable; o : absence de pic.

Cépages	A	B	C	D	E	F	G	H	L	Σ des constituants volatils	Acidité (g/l)	Sucre (g/l)
Hambourg :												
vert	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	1,2	11,6	86
véré	+	1,7	0	0,9	0	0	0	0	1,3	3,9	6,7	126
mûr	1	3,0	0	2,0	0,8	0	0	2,3	45,2	54,3	5,0	177
Alexandrie :												
début véraison	+	0,8	0,9	0	0	0	0	0	2,3	4,0	10,5	117
véré	+	+	0,9	0	0	0	0	0	3,9	4,8	8,8	137
mûr	+	1,7	0,9	0,7	+	0	0	0	25,7	29,0	4,1	172
Frontignan :												
début véraison	0	2,0	1,6	+	0	0	0	0	2,3	5,9	24,2	82
véré	0	3,0	0,8	1,5	0	0	0	0	4,6	9,9	10,0	133
mûr	0	4,4		2,5	+	4,4	4,1	0	5,6	21,0	4,2	223


Profil a
1
2
4
B
6
12
18
21
24
27
30
36
55°
55° à 150°
150°
temps
température


Profil b
4
1
2
3
A
B
D
L
6
12
18
21
24
27
30
36
42
55°
55° à 150°
150°
temps
températures

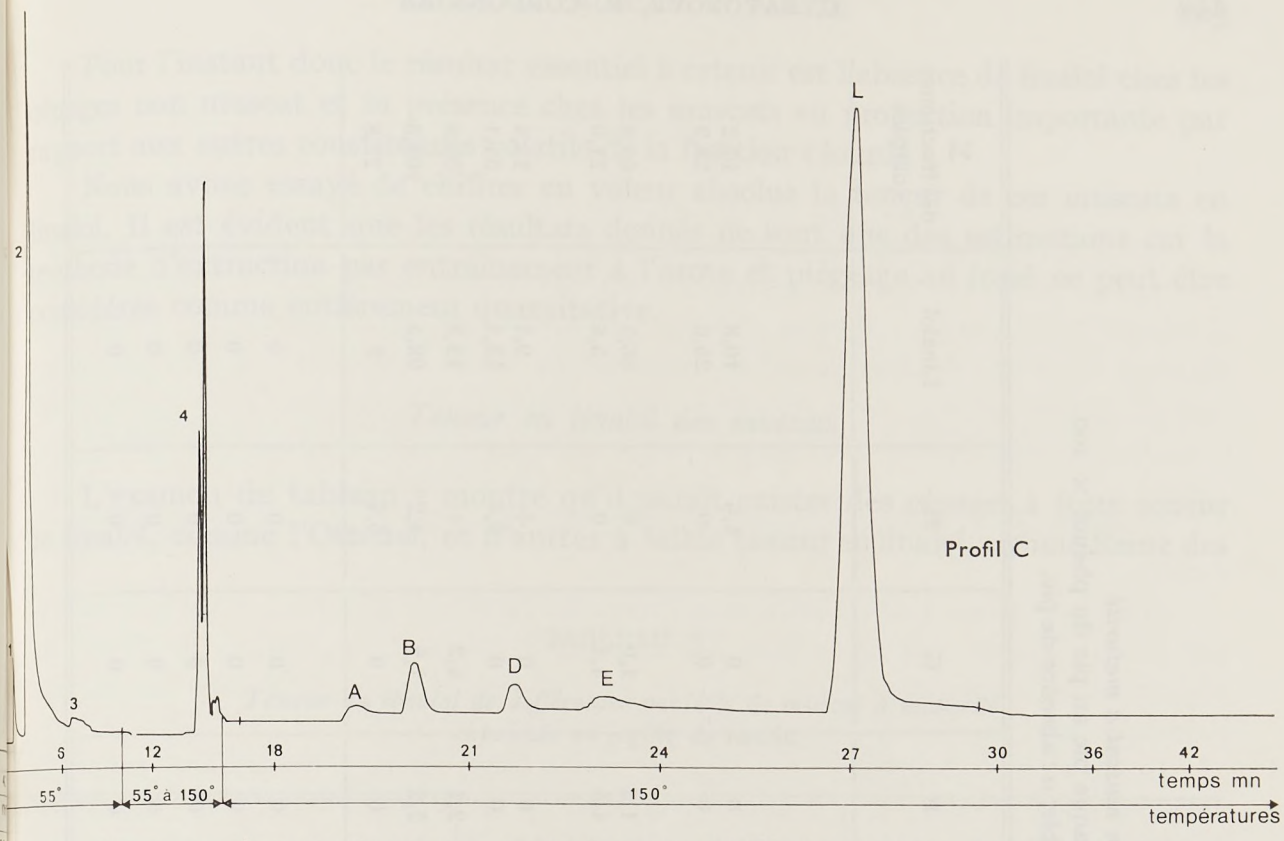


FIG. 2. — *Évolution des constituants volatils du muscat de Hambourg au cours de la maturation. Chromatogrammes réalisés par injection directe d'extraits piégés à froid.*

Profil a : raisin vert — Profil b : raisin début véraison — Profil c : raisin mûr.

Chez le Muscat de Frontignan, la faible teneur en linalol de la baie mûre peut provenir du fait que le dernier prélèvement a été réalisé à un stade avancé de maturité. Nous avons observé, en effet, une diminution rapide de la teneur en linalol au cours de la surmaturation (BAYONOVE, CORDONNIER, 1970).

Comparaison des profils aromatiques des cépages muscat et non muscat

Si nous nous reportons à l'exemple des profils aromatiques de cépage muscat et non muscat, donné dans la figure 1, et à l'ensemble des résultats rassemblés dans le tableau 2, on constate que dans la première partie des profils aromatiques des cépages non muscat il existe autant de fractions volatiles A, B, C, D, que dans ceux des cépages muscat.

Par contre on remarque une absence totale de pics au-delà de la fraction D. Donc les produits à point d'ébullition supérieur à celui de la fraction D, le linalol en particulier, sont absents chez les cépages non muscat, ou en trop faible concentration pour être repérés avec les moyens analytiques utilisés.

Le linalol est au contraire présent chez tous les muscats et en quantité importante puisque chez la plupart d'entre eux il représente 60 à 90 p. 100 de la somme des constituants volatils compris dans la fraction volatile étudiée.

Dans le détail, il apparaît quelques différences dans le profil aromatique de chacune des variétés de muscat; ceux de Ottonel et Fleur d'Oranger, avec les 9 fractions représentées, sont les plus complets, celui de Reine des Vignes est le plus pauvre. Mais on observe aussi quelques différences pour une même variété suivant l'aire de production.

TABLEAU 2

Profils aromatiques de cépages muscat et non muscat à maturité

Les nombres correspondent au rapport des surfaces de chaque pic au pic du phénol × 100.

Signe + = présence d'un pic mais non mesurable; o : absence de pic.

Cépages	A	B	C	D	E	F	G	H	Linalol	Σ des fractions volatiles
Muscat										
Alexandrie :										
École	1,5	1,5	0,7	1,1	+	0	0	1,6	10,8	17,2
Jarras	+	1,7	0,9	0,7	+	0	0	0	25,6	28,9
Frontignan :										
École	1,4	3,1	+	1,8	+	1,2	1,0	0	56,5	65,0
Frontignan	0	4,4	0	2,5	+	4,4	4,1	0	5,6	21,0
Hambourg :										
École	0,4	1,3	0	0,6	0	0	0	+	9,1	11,4
Jarras	1,1	2,9	0	1,9	0,8	0	0	2,3	45,1	54,1
Fleur d'Oranger	1,8	4,7	1,1	2,1	+	2,1	4,2	+	19,8	35,8
Ottonel	1,5	2,4	0,4	1,6	+	2,2	1,9	1,2	98,5	109,3
Reine des vignes	1,0	6,4	0	5,0	+	0	0	5,4	3	22,8
Non Muscat										
Cabernet-Sauvignon	1,5	6,1	1,6	6,3	0	0	0	0	0	
Chasselas	1,2	1,9	0	1,2	0	0	0	0	0	
Merlot	1,0	2,6	0	2,4	0	0	0	0	0	
Piquepoul	0	3,8	6,6	1,7	0	0	0	0	0	
Syrah	1,1	6,6	1,4	3,7	0	0	0	0	0	

Pour l'instant donc le résultat essentiel à retenir est l'absence de linalol chez les cépages non muscat et sa présence chez les muscats en proportion importante par rapport aux autres constituants volatils de la fraction « lourde ».

Nous avons essayé de chiffrer en valeur absolue la teneur de ces muscats en linalol. Il est évident que les résultats donnés ne sont que des estimations car la méthode d'extraction par entraînement à l'azote et piégeage au froid ne peut être considérée comme entièrement quantitative.

Teneur en linalol des muscats

L'examen du tableau 3 montre qu'il paraît exister des cépages à forte teneur en linalol, comme l'Ottonel, et d'autres à faible teneur en linalol, comme Reine des

TABLEAU 3

Teneur en linalol de différentes variétés de muscat à maturité exprimée en µg/kg de raisin

Cépages	Linalol µg/kg	Acidité g/l	Sucre g/l	Sucre / Acidité
Muscat d'*Alexandrie* :				
École	35	4,6	126	27,4
Jarras	50	4,1	172	42
Muscat de *Frontignan* :				
École	250	4,4	224	51
Frontignan	22	4,2	223	53
Muscat de *Hambourg* :				
École	30	3,9	143	36,6
Jarras	120	5,0	177	35,4
Muscat *Fleur d'Oranger* :	70	2,5	166	66,5
Muscat *Ottonel*	590	2,0	197	98,5
Muscat *Reine des Vignes*	14	2,6	164	63

Vignes; cependant les écarts observés entre variétés ne sont guère plus importants que les écarts, pour une même variété, entre deux lots prélevés dans des aires de production différentes.

L'exemple des deux échantillons de Muscat de Frontignan est significatif. Si l'on se réfère à leurs teneurs en sucre et en acidité, ils paraissent avoir atteint le même degré de maturité; cependant l'échantillon de Frontignan a été récolté deux semaines plus tard après avoir donc subi deux semaines d'ensoleillement supplémentaires.

Ainsi des facteurs qui nous échappent encore paraissent intervenir au moins autant que le facteur variétal dans la teneur en linalol des muscats.

DISCUSSION — CONCLUSION

Le linalol est présent chez tous les muscats étudiés : Alexandrie, Hambourg, Frontignan, Fleur d'Oranger, Ottonel, Reine des Vignes (tabl. 2). Sa présence a été constatée aussi chez le Muscat d'Adda, Dalmaso II-6 (Hambourg × Reine des Vignes), Pirovano I (Hambourg × Chasselas Rosé), le Muscat de Syracuse (Usseglio-Tomasset, 1966), chez Aléatico, Early Muscat, P 20-59 et Q 26-39 issus du croisement des Muscats de Hambourg et Reine des Vignes (Webb, Kepner, Maggiora, 1966).

Il paraît ainsi bien établi que la présence du linalol est une constante des cépages muscat.

Il est par contre absent, ou tout au moins en trop faible quantité pour être décelé par les techniques utilisées, chez le Cabernet-Sauvignon, le Merlot, la Syrah, le Piquepoul et le Chasselas (tabl. 2). Il n'a pas été non plus identifié chez les cépages italiens à goût simple (Usseglio-Tomasset, 1966).

Ces résultats concernant les cépages non muscat ne sont cependant pas assez nombreux pour établir si le linalol est ou non un constituant volatil spécifique des cépages muscat. Nous ne savons pas encore en particulier si certains cépages non muscat à goût musqué en renferment.

Le linalol subit une évolution parallèle au cours de la maturation chez les Muscats d'Alexandrie, Frontignan et Hambourg (fig. 1, tabl. 1), il apparaît dans le raisin en même temps que l'odeur de muscat et il est le seul à avoir été décelé par l'analyse olfactive (Bayonove, Cordonnier, 1970). Il est par ailleurs le constituant volatil le plus important de la fraction « lourde » (tabl. 2).

D'autre part la teneur en linalol croît dans bien des cas avec la puissance de l'arôme musqué (Webb, Kepner, Maggiora, 1966), comme si cet arôme était directement relié à la concentration en linalol.

Cependant certaines variétés ont un intense arôme de muscat, Q 26-39, et une teneur modérée en linalol, ou au contraire une forte teneur en linalol, P 20-59, et un arôme assez différent de muscat (Webb, Kepner, Maggiora, 1966). Le Riesling rhénan renferme également du linalol (Usseglio-Tomasset, Astegiano, Matta, 1966).

Nous avons aussi constaté que l'addition de linalol à un jus neutre (Ugni Blanc), s'il lui confère un parfum floral agréable, ne permet pas d'assimiler ce parfum à celui du muscat.

Il ne fait donc pas de doute que d'autres constituants interviennent dans cet arôme et il est possible que parmi eux les fractions volatiles repérées en très faible quantité dans les muscats et absentes chez les non muscats (tabl. 2 : fraction E, F, G, H) contribuent à donner aux premiers leur « vrai caractère ».

Il reste aussi à apprécier la participation de la fraction « légère » que nous avons laissée délibérément de côté dans ce travail.

Reçu pour publication en mai 1969.

SUMMARY

RESEARCHES ON THE AROMA OF MUSCAT
II. — AROMATIC PROFILES OF MUSCAT AND NON-MUSCAT WINE-PLANTS. THE IMPORTANCE OF LINALOL IN THE MUSCATS

Comparison of the aromatic profiles of different Muscat and non-Muscat wine-plants has permitted a certain number of volatile constituants to be shown, which distinguish the first from the second.

Amongst these constituants linalol is particularly important : it is present in all the Muscats studied : *Alexandria, Hambourg, Frontignan, Ottonel, Flower of Oranger, Queen of Vines,* and in considerable proportion in relation to other constituants.

Linalol undergoes an identical development during the maturation of the *Alexandria, Hambourg* and *Frontignan Muscats.*

RESUMEN

INVESTIGACIONES ACERCA DEL AROMA DEL MOSCATEL
II. — PERFILES AROMATICOS DE CEPAS DE MOSCATEL Y NO MOSCATEL. IMPORTANCIA DEL LINALOL EN LOS MOSCATELES

La comparación de los perfiles aromáticos de distintas cepas de moscatel y no moscatel ha permitido hacer resaltar la presencia de cierto número de componentes volátiles que distinguen los primeros de los segundos.

Entre estos componentes, el linalol tiene particular importancia y se encuentra presente en todos los moscateles examinados : Alejandría, Hamburgo, Frontignan, Ottonel, Flor de Naranja, Reina de las Viñas, y ello en proporción importante en relación con los demás componentes.

El linalol sufre una evolución identica durente el transcurso de la maduración en el caso de los moscateles de Alejandría, Hamburgo y Frontignan.

RIASSUNTO

RICERCA SULL'AROMA DEL MOSCATO.
PROFILI AROMATICI DI VITIGNI MOSCATO E NON MOSCATO. IMPORTANZA DEL LINALOLO NEI MOSCATI

Il confronto dei profili aromatici dei vari vitigni moscato e non moscato, ha permesso di mettere in evidenza un certo numero di costituenti volatili che distinguono i primi dai secondi.

Tra questi constituenti, il linalolo ha un'importanza particolare : esso è presente in tutti i moscati studiati ; *Alessandria, Amburgo, Frontignan, Ottonel, Fior d'arancio, Regina delle vigne.* Esso vi si trova inoltre in proporzione rilevante in rapporto agli altri costituenti.

Il linalolo subisce una evoluzione identica durante la maturazione nei *Moscati d'Alessandria, Amburgo* e *Frontignan.*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bayonove C., Cordonnier R., 1970. Recherches sur l'arôme du muscat. I. Évolution des constituanst volatils au cours de la maturation du muscat d'Alexandrie. *Ann. Technol. agric.*, **19** (2), 79-93.

Usseglio-Tomasset L., 1966. L'aroma di moscato nelle uve e nei vini. *Industr. agrar.*, **4** (5), 216.

Usseglio-Tomasset L., Astegiano V., Matta M., 1966. Il linalolo composto responsabile dell'aroma delle uve e dei vini aromatici. *Industr. agrar.*, **4** (12), 583-584.

Webb A. D., Kepner R. E., Maggiora L., 1966. Gas chromatographic comparison of volatile aroma materials extracted from eight different muscat flavored varieties of *Vitis vinifera. Amer. J. Enol. Vitic.*, **17** (4), 247-254.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (2), 107-130.

EMPLOI DE L'ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE POUR METTRE EN ÉVIDENCE ET DOSER LE LAIT DE VACHE AJOUTÉ AU LAIT DE CHÈVRE. APPLICATION AU CAS DES FROMAGES

Alice PIERRE et A. PORTMANN

Laboratoire de Technologie laitière, 17 - Surgères
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Les méthodes actuelles de détection, dans le fromage, d'une addition de lait de vache au lait de chèvre sont basées sur la différence de composition de la matière grasse du lait de ces deux espèces animales. Par conséquent, elles ne permettent pas de mettre la fraude en évidence lorsque celle-ci a été effectuée avec du lait écrémé et l'on doit alors faire porter cette étude sur la fraction protéique. Aussi avons-nous adopté la méthode basée sur la différence de migration électrophorétique des caséines α_{s1} du lait de vache et du lait de chèvre.

A partir de fromages dans la composition desquels entraient des quantités définies de lait de vache et de chèvre, nous avons étudié l'application pratique de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à la détection et au dosage du lait de vache additionné au lait de chèvre et nous proposons un modèle d'interprétation des résultats construit à partir de l'analyse des valeurs trouvées lors de cette expérimentation.

INTRODUCTION

La mise en évidence d'une addition de lait de vache au lait de chèvre est relativement aisée lorsqu'elle est effectuée sur le lait en nature, par la méthode sérologique décrite par HADLAND et SOLBERG (1953). Cependant, le contrôle effectué par les services officiels ne peut être fait, pratiquement, que sur le fromage au stade de la vente et dans ce cas la méthode sérologique n'est pas applicable.

Les autres méthodes actuellement utilisées en France sont basées sur la différence de composition de la matière grasse du lait de vache et du lait de chèvre. LOPEZ

(1934) a indiqué une méthode permettant de déterminer la teneur de l'échantillon en acide caprylique, puis de calculer « l'Indice caprylique » dont la valeur est fonction de la proportion relative de matière grasse de chacune des deux espèces animales dans le mélange. Chollet et Camus (1937) ont utilisé les différences dans les proportions relatives d'acides volatils solubles et insolubles des matières grasses du lait de chèvre et de vache. Cependant, ces auteurs ont montré (Chollet et Camus, 1938) que le rapport variait considérablement au cours de la lactation et ils ont insisté sur les précautions qu'il y avait lieu de prendre pour interpréter convenablement les résultats. Kuzdzal et Kuzdzal (1959) ont étudié une méthode de dosage du β-carotène dans le lait et le fromage. Ce pigment liposoluble est absent dans la graisse du lait de chèvre mais présent dans celle du lait de vache.

Toutefois, lorsque la fraude est effectuée avec du lait écrémé de vache, aucune de ces méthodes ne peut la mettre en évidence. L'étude doit alors porter sur la fraction protéique. Pour détecter le lait de vache additionné au lait de chèvre, Aschaffenburg (1964, *a*) utilise une technique basée sur l'observation suivant laquelle la caséine α_{s1} du lait de vache présente une plus grande mobilité électrophorétique que la caséine α du lait de chèvre. Il effectue l'électrophorèse en gel de polyacrylamide ou en gel d'agar et signale que l'on peut ainsi détecter une addition de 1 à 2 p. 100 de lait de vache dans du lait de chèvre. Dans une étude sur le lait de diverses espèces, Albonico *et al.* (1966, *a*) signalent que, par électrophorèse sur acétate de cellulose, il est possible de mettre en évidence 5 p. 100 de lait de vache ajouté au lait de chèvre. Assenat (1967) applique l'électrophorèse en gel de polyacrylamide aux protéines du fromage pour détecter l'addition de lait de vache au lait de brebis entrant dans la fabrication du Roquefort.

Dans le travail que nous présentons ici, nous avons eu pour but d'étudier l'application pratique de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à la détection et au dosage du lait de vache en mélange avec du lait de chèvre.

Nous avons effectué cette étude, d'une part sur des laits de vache et de chèvre mélangés en proportion connue, d'autre part sur des fromages fabriqués expérimentalement, dans lesquels entraient des quantités définies de lait de chèvre et de lait de vache.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Fromages

Nous avons procédé à la fabrication de fromages de plusieurs types.

1. Fromages ayant les dimensions du Camembert et dont le moulage est effectué 2 h 30 après l'emprésurage.

2. Fromages Sainte-Maure et Chabichou moulés 24 heures seulement après l'emprésurage.

Ces fromages ont été préparés avec des mélanges de lait, réalisés à partir de quantités connues de lait de vache et de chèvre.

Des échantillons ont été prélevés aussitôt après le moulage et après 10, 20 et 60 jours de maturation.

Électrophorèse

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est effectuée selon la technique décrite par Aschaffenburg (1964, *b*).

Le gel de polyacrylamide est coulé dans des cuves rectangulaires en matière plastique composées des éléments suivants :

a) une plaque de base de 20,0 × 11,5 × 0,3 cm ;

b) une plaque de 17,5 × 9,0 × 0,3 cm, fixée sur la première ;

c) un cadre amovible de 0,6 cm d'épaisseur, s'emboîtant exactement autour de la plaque *b* et ayant les mêmes dimensions extérieures que la plaque *a* ;

d) L'ensemble est recouvert par une plaque de 20,0 × 11,5 × 0,3 cm.

Les dimensions utiles du moule sont : 17,5 × 9,0 × 0,3 cm, soit un volume de 48 cm^3 environ.

Les gels sont obtenus par polymérisation, à l'abri de l'air et en présence de deux catalyseurs, d'une solution d'acrylamide et de NN′ méthylène *bis*-acrylamide.

Préparation de la solution d'acrylamide.

a) *Pour une électrophorèse de caséine :*

Cyanogum 41 [1] : 3 g (contenant le mélange d'acrylamide et de NN′ méthylène *bis*-acrylamide).
Tampon véronal stock dilué au 1/10e : 60 ml. (Le tampon stock contient 8 mM de véronal et 40 mM de véronal sodique par litre, pH 8,6).
Catalyseur { Solution à 10 p. 100 de diméthylaminopropionitrile (DMAPN) : 1,2 ml.
Solution à 10 p. 100 de persulfate d'ammonium : 0,6 ml.
Urée : 18 g.

b) *Pour une électrophorèse de protéine soluble*, on utilise une solution de même composition que pour les caséines, mais ne contenant pas d'urée.

Si l'on veut préparer la solution d'acrylamide à l'avance et la conserver au réfrigérateur, on y incorpore un seul des catalyseurs au moment de la préparation ; la solution de persulfate est additionnée lors de l'utilisation.

La solution d'acrylamide est coulée dans les cuves dont le couvercle et le cadre ont été préalablement enduits de graisse siliconée. La polymérisation se produit rapidement à l'abri de l'air et est complète en 3 heures environ.

Pour réaliser l'électrophorèse, le couvercle de la cuve est enlevé à l'aide d'une spatule. Des rectangles de papier Whatman 3 MM (1,2 × 0,25 cm) imprégnés chacun d'une des solutions à analyser, sont posés sur un papier-filtre pour éliminer l'excédent de liquide, puis insérés verticalement dans une fente ouverte dans le gel à 3,5 cm environ de l'une de ses extrémités. Il faut éviter l'inclusion de bulles d'air entre le gel et le papier-filtre. Il est possible de placer 4 à 5 échantillons dans la largeur de la plaque.

On peut modifier la distance d'implantation des échantillons par rapport à l'extrémité du gel : si on augmente cette distance, on obtient une vitesse de migration moins grande mais une meilleure résolution des taches.

On applique ensuite à chaque extrémité du gel une double épaisseur de papier Whatman 3 MM imbibé de tampon véronal stock. Le couvercle de polyéthylène est replacé sur le moule. Les ponts de papier Whatman sont protégés contre l'évaporation par une petite bande de papier cellophane.

Les plaques sont alors placées entre des bacs à électrophorèse constitués par deux cuves parallélépipédiques en matière plastique, parcourues sur toute leur longueur par un fil de platine. Les bacs sont remplis de tampon véronal stock, les ponts de papier plongeant dans le tampon. La jonction électrique est réalisée de manière à ce que les échantillons se trouvent du côté de la cathode ; la migration des protéines se fera vers l'anode.

Pour les protéines solubles, l'électrophorèse dure 4 heures à la température ordinaire avec un courant de 10 mA par plaque, correspondant à un voltage initial de 130 V environ : pour les caséines, on opère à 4°C pendant 8 heures avec un courant de 5 mA par plaque, soit un voltage initial de 90 V environ.

Dans nos expériences, nous utilisons un générateur de courant continu (Eelite Power Unit 600 V, 50 mA) à ampérage constant.

Les gels sont colorés pendant 2 minutes dans une solution de Noir amido (1 g de Noir amido est dissous dans 250 ml de méthanol, puis on ajoute 650 ml d'eau et 100 ml d'acide acétique glacial ; agiter et filtrer) ; ils sont ensuite lavés jusqu'à décoloration dans l'acide acétique à 10 p. 100 v/v ; placer alors les gels dans la solution suivante (méthanol-eau-acide acétique, 30/60/10) pendant 2 à 3 heures.

[1] Apelab, 35 rue des Écoles, 92 - Bagneux.

Le séchage est réalisé selon la technique décrite par ASSENAT (1967), qui consiste à placer le gel entre deux feuilles de cellophane mouillées : une première feuille est appliquée sur un support rigide et plan, sa tension étant assurée en repliant ses bords autour du support ; le gel est posé sur la cellophane, la seconde feuille est alors appliquée de la même manière en évitant l'inclusion de bulles d'air. Sécher à l'air ou à l'aide d'un ventilateur.

Après séchage complet, des bandes sont découpées pour effectuer la lecture au densitomètre. Sous cette forme, les gels peuvent être conservés très longtemps à condition d'être maintenus à plat.

L'analyse photométrique des bandes d'électrophorèse est effectuée au moyen d'un photomètre manuel (Eel Scanner) qui, par défilement de la bande colorée entre une fente lumineuse et une cellule photoélectrique, donne la densité optique à partir de laquelle on construit les courbes correspondantes. L'aire des courbes est mesurée par planimétrie manuelle.

Préparation des échantillons

Le mode opératoire suivi pour la préparation de la caséine et des protéines solubles à partir du lait amené à pH 4,6 est identique à celui décrit par ASSENAT (1967). A partir du fromage, la préparation de la fraction protéique précipitable à pH 4,6 est très peu différente. Pour le fromage de chèvre, on opère de la manière suivante : dans un tube de centrifugeuse de 50 ml, dans lequel le broyage sera effectué directement, ou dans un autre récipient *ad hoc*, peser 1,2 g de fromage prélevé dans la partie centrale de l'échantillon, ajouter 30 ml d'eau distillée et mélanger à l'aide d'un mixer pendant deux minutes. Éliminer la graisse rassemblée en surface, ajuster à pH 4,6. Centrifuger à 3 000 tours pendant 3 minutes, rejeter le surnageant. Le culot de centrifugation est dispersé et dissous dans 5 ml d'urée 7 M, le pH est amené à 7. On élimine les traces de matière grasse en ajoutant 20 ml de tétrachlorure de carbone, on agite fortement et on centrifuge. La phase supérieure contient la fraction protéique du fromage insoluble à pH 4,6 dissoute dans l'urée. On prélève 1 ml de cette solution et on le dilue au 1/2 dans l'urée 7 M ; cette dernière solution possède dans la plupart des cas une concentration convenable pour l'électrophorèse.

Si la solution doit être conservée en vue d'une analyse ultérieure, il est nécessaire de la conserver à une température inférieure à 0°C et de préférence vers — 15°C.

Dosage des protéines

1. *Lait.* — Sur les échantillons de lait, nous avons évalué la quantité de protéines totales et de protéines non caséine par dosage d'azote (microkjeldahl), en appliquant la méthode de ROWLAND (1938).

2. *Fromage.* — Les échantillons de fromage ont été préparés selon la méthode de VAKALERIS (1959) qui permet de séparer les fractions protéiques solubles et insolubles à pH 4,6 ; sur chaque fraction, nous avons dosé l'azote par microkjeldahl.

RÉSULTATS

Étude électrophorétique comparée du lait de vache et du lait de chèvre

La différenciation des protéines du lait de vache de celles du lait de chèvre peut être obtenue en effectuant l'électrophorèse soit sur la fraction caséine (ASCHAFFENBURG, 1964 *a*), soit sur la fraction protéique non précipitable à pH 4,6 (KALAN et BASCH, 1966).

La figure 1 montre une électrophorèse en gel de polyacrylamide en urée de caséines de vache et de chèvre. On a appelé α et β les bandes de la caséine de chèvre, par analogie avec celles de vache. La caséine β de vache migre sensiblement à la même distance que la caséine β de chèvre ; par contre, les caséines α ont une migration différente.

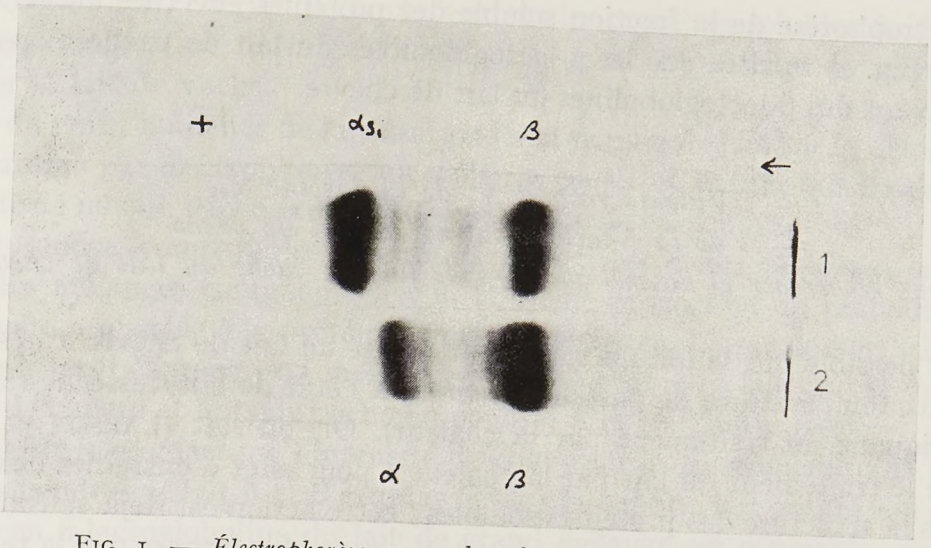


FIG. 1. — *Électrophorèse en ge de polyacrylamide de caséine entière de lait de vache* (1) *et de chèvre* (2)

Les migrations peuvent être mesurées par la distance des bandes à l'origine (Rf) ; l'unité employée, selon WAKE et BALDWIN (1960), est la distance à l'origine d'une bande de la caséine entière de vache, bande située en arrière de la caséine α_{s1} (fig. 1). Les valeurs que nous avons trouvées pour la caséine α_{s1} de vache varient de 1,10 à 1,21 ; ces variations sont dues à l'existence de variants génétiques de la caséine α_{s1} ayant chacun des migrations un peu différentes (THOMPSON et KIDDY, 1964).

La caséine α_{s1} que nous avons rencontrée le plus fréquemment est la caséine α_{s1}B dont le Rf est de 1,15 ; ceci est en accord avec les résultats obtenus par KIDDY *et al.* (1964) concernant la fréquence d'apparition des variants. La caséine α_{s1} de chèvre a une migration de 1,00 à 1,05 selon l'échantillon.

FIG. 2. — *Électrophorèse en gel de polyacrylamide sans urée de la fraction protéique soluble à pH 4,6 de lait de vache* (1) *et de lait de chèvre* (2)

L'électrophorèse de la fraction soluble des protéines effectuée en gel de polyacrylamide (fig. 2) montre que les β-lactoglobulines du lait de vache migrent nettement en avant des β-lactoglobulines du lait de chèvre.

Valeurs respectives de la caséine α_{s1}
et de la β-lactoglobuline du lait de vache
pour rechercher et doser l'addition de lait de vache au lait de chèvre

Il est possible que le lait de vache soit ajouté au lait de chèvre après avoir été chauffé aux températures de pasteurisation ou à l'état de lait desséché (la dessiccation impliquant un traitement par la chaleur). Or, on sait (LARSON et ROLLERI, 1955) que le traitement du lait par la chaleur a pour effet d'entraîner des modifications dans la structure des protéines solubles ; cette action est déjà sensible pour un chauffage à 70°C pendant 30 minutes et est d'autant plus intense que la température est plus élevée. Par la suite, ZITTLE *et al.* (1962) ont précisé que la β-lactoglobuline se complexe avec la caséine κ au cours du chauffage et HUNZIKER et TARASSUK (1965) ont montré qu'il y avait également une interaction de l'α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline.

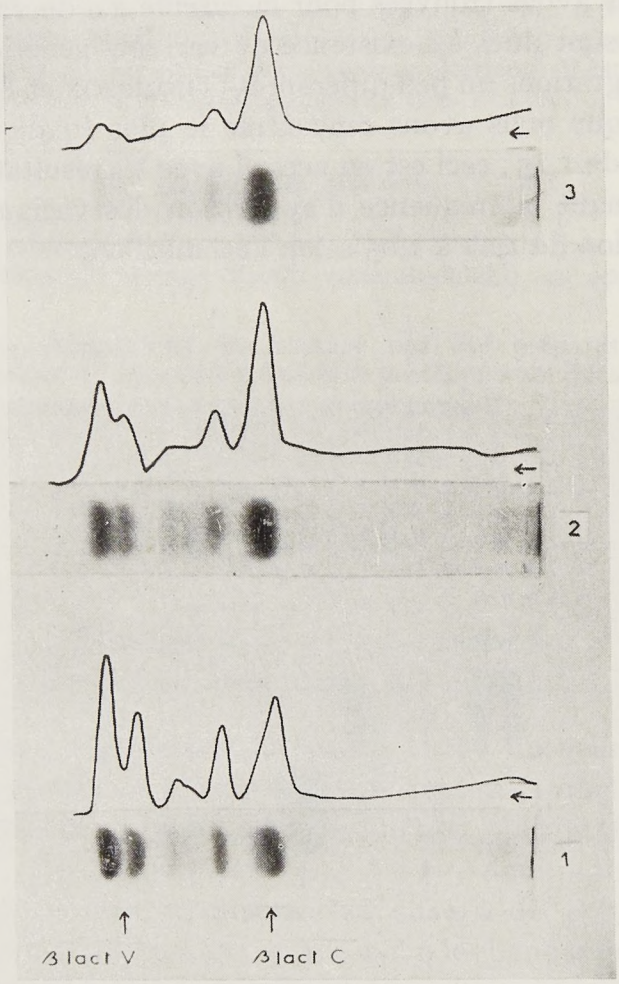


FIG. 3. — *Électrophorèse en gel de polyacrylamide sans urée de la fraction protéique soluble à pH 4,6 de lait de chèvre additionné de 50 p. 100 de lait de vache cru* (1), *de poudre de lait de vache A* (2), *de poudre de lait de vache B* (3).

Par conséquent, l'action de la chaleur sur les protéines solubles doit limiter les possibilités d'utilisation de la β-lactoglobuline comme protéine de référence pour rechercher le lait de vache.

Afin de voir l'influence de l'utilisation de la poudre de lait sur la détection, nous avons examiné par électrophorèse un mélange constitué par du lait de chèvre additionné soit de lait de vache cru, soit de lait de vache en poudre.

Pour rendre comparables quantitativement les électrophorèses, nous avons effectué des mélanges contenant chacun la même proportion de protéine totale de lait de vache rapportée à la protéine totale du mélange. Le même échantillon de lait de chèvre a servi à préparer 3 mélanges : lait de chèvre et lait cru de vache d'une part, lait de chèvre et laits de vache en poudre, A et B, d'autre part.

La figure 3 montre que l'intensité de coloration correspondant à la β-lactoglobuline des poudres de lait A et B est plus faible que celle du lait cru. Si l'on admet que la teneur en β-lactoglobuline du lait de grand mélange est constante, ces résultats montrent que, dans les poudres de lait, cette protéine a été modifiée dans des proportions importantes. Nous avons construit les courbes densitométriques correspondant à chacune des bandes d'électrophorèse et, après avoir mesuré la surface, nous avons calculé pour chaque mélange le rapport de la β-lactoglobuline de vache à celle de chèvre, cette dernière étant prise comme référence. On en déduit une valeur conventionnelle (V), que l'on suppose égale à 100 dans le cas du lait cru et qui, dans le cas des laits en poudre, donne une idée sur les modifications entraînées par le séchage. Les résultats (tabl. 1) montrent que la teneur en β-lactoglobuline du lait en poudre A est deux fois plus faible que celle du lait cru et que celle de B est environ 20 fois plus faible.

TABLEAU I

Dosage de la β-lactoglobuline de vache par électrophorèse dans un mélange composé de lait de chèvre cru et de lait de vache, cru ou à l'état de poudre

Nature du lait de vache additionné au lait de chèvre cru	Rapport de la β-lactoglobuline de vache à la β-lactoglobuline de chèvre	V*
Lait cru	1,58	100
Poudre de lait A	0,70	44
Poudre de lait B	0,08	5

* Voir texte.

La proportion de protéine de lait de vache, en p. 100 des protéines totales, était la même dans les 3 mélanges.

Ces résultats montrent qu'il ne serait guère prudent d'utiliser la β-lactoglobuline pour détecter ou mesurer l'addition de lait de vache au lait de chèvre. Par contre, comme le traitement thermique utilisé lors de la préparation de la poudre de lait n'a pas d'influence sensible sur la caséine, nous avons adopté la méthode basée sur les différences de migration des caséines α_{s1} pour détecter le lait de vache additionné au lait de chèvre.

Évaluation quantitative du lait de vache dans un mélange

Principe de la méthode.

L'évaluation quantitative de la proportion de lait de vache ajouté au lait de chèvre consistera à mesurer la teneur du mélange en caséine α_{s1} de vache et à comparer cette valeur à la teneur moyenne en caséine α_{s1} du lait de vache pur.

$$x = \frac{\alpha_E}{\alpha_T} \times 100 \qquad (1)$$

où x = g de protéines de lait de vache dans 100 g de protéines de l'échantillon étudié.

α_E = teneur de l'échantillon en caséine α_{s1} de vache en p. 100 des caséines totales.

α_T = teneur moyenne du lait de vache en caséine α_{s1} en p. 100 des caséines totales.

Nous avons calculé α_T à partir des résultats rassemblés à la suite d'une étude sur la teneur en caséine α_{s1} du lait de vache.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a été effectuée sur la caséine isolée de chacun des échantillons de lait ; ceux-ci correspondaient à un mélange du lait de 6 à 7 vaches.

Nous avons ensuite construit la courbe densitométrique correspondant à chacune des bandes et mesuré la surface correspondant à la caséine α_{s1} et à la caséine totale. Nous avons ensuite calculé la proportion de caséine α_{s1} pour chacun des échantillons et la valeur moyenne de l'ensemble.

Les résultats sont reportés sur le tableau 2 ; nous avons trouvé pour la caséine α_{s1} de vache une valeur moyenne de 38,9 p. 100.

Il faut noter que ces chiffres ne traduisent pas exactement la teneur du lait en caséine α_{s1} puisqu'on ne sait pas avec précision quelle est la capacité de fixation des diverses caséines pour le Noir amido.

Sur le tableau 2, nous avons également reporté les valeurs de α trouvées pour le lait de chèvre (lait de mélange de 150 animaux environ) ainsi que les valeurs trouvées par Albonico *et al.* (1966, *b*) qui ont utilisé la méthode d'électrophorèse en acétate de cellulose.

Calcul de la proportion de lait de vache additionné au lait de chèvre

La mesure de la quantité de caséine α_{s1} (α_E) d'un mélange de lait de vache et de lait de chèvre est effectuée à partir de la bande correspondante de l'électrophorégramme et, pour éliminer l'influence des conditions opératoires (variation dans la concentration en protéine de l'échantillon ou dans la quantité de protéines apportée lors de l'insertion du papier dans le gel ou encore dans l'intensité de coloration des protéines), nous avons calculé la proportion de α_E par rapport à d'autres protéines du même électrophorégramme.

Nous avons envisagé deux méthodes de calcul :

Méthode 1.

Dans cette méthode, on calcule le rapport de la surface de la courbe densito-

métrique relative à la bande α_E à la surface totale de l'électrophorégramme ; celle-ci correspond à la caséine totale de l'échantillon (C_E).

La formule (1) devient :

$$x = \frac{100\ S\alpha_E/SC_E}{38{,}9} \times 100 \qquad (2)$$

où $S\alpha_E$ = Surface de la courbe densitométrique correspondant à α_E
SC_E = Surface de l'ensemble des courbes densitométriques correspondant à la totalité de la caséine de l'échantillon (C_E)
38,9 = α_T de la formule (1).

Méthode 2.

Pour supprimer l'imprécision qui existe parfois dans l'évaluation de la surface totale par suite de la présence de traînée sur les électrophorégrammes, nous avons calculé le rapport de $S\alpha_E$ à la surface de la courbe densitométrique correspondant cette fois à la caséine β de l'échantillon ($S\beta_E$).

On mesure donc le rapport $r = S\alpha_E/S\beta_E$.

Comme les caséines β du lait de vache et du lait de chèvre migrent au même niveau et qu'elles ne sont pas présentes au même taux dans les caséines des deux espèces animales (vache 36,2 p. 100, chèvre 64,9 p. 100, voir tabl. 2), l'utilisation de ce rapport oblige à introduire une correction.

TABLEAU 2

Teneur moyenne du lait de vache et de chèvre en caséine α et β

	Pierre et Portmann	Albonico *et al.*
	p. 100 de la caséine totale	p. 100 de la caséine totale
Vache		
Nombre d'échantillons	36	47
Teneur en caséine αs_1	38,9	33,5
Écart-type	4,9	
Teneur en caséine β	36,2	37,3
Écart-type	4,4	
Chèvre		
Nombre d'échantillons	25	16
Teneur en caséine α	21,6	29,2
Écart-type	3,6	
Teneur en caséine β	64,9	63,4
Écart-type	3,9	

Si l'on exprime β_E en fonction du taux de caséine β de chèvre (β_c) et de vache (β_v) en tenant compte du pourcentage x de lait de vache dans le mélange, on obtient :

$$r = \frac{\alpha_E}{x\beta_v + (100 - x)\ \beta_c} \times 100$$

d'où, $$\alpha_E = \frac{r}{100} x\,\beta_v + (100 - x)\,\beta_c.$$

En se basant sur l'équation (1), on peut écrire :

$$x = r\,\frac{x\beta_v + (100 - x)\,\beta_c}{\alpha_T}$$

ou $$x = \frac{100\,r\,\beta_c}{\alpha_T - r\,(\beta_v - \beta_c)}$$

En remplaçant par les valeurs moyennes précisées au cours de l'enquête, on a :

$$x = \frac{226\,r}{1{,}355 + r} \qquad (3)$$

où $r = S\alpha_E/S\beta_E$.

Exemple de mesure et de calcul

La figure 4 montre l'électrophorèse de la fraction caséine d'un fromage de 20 jours fabriqué avec un mélange de lait de vache et de lait de chèvre.

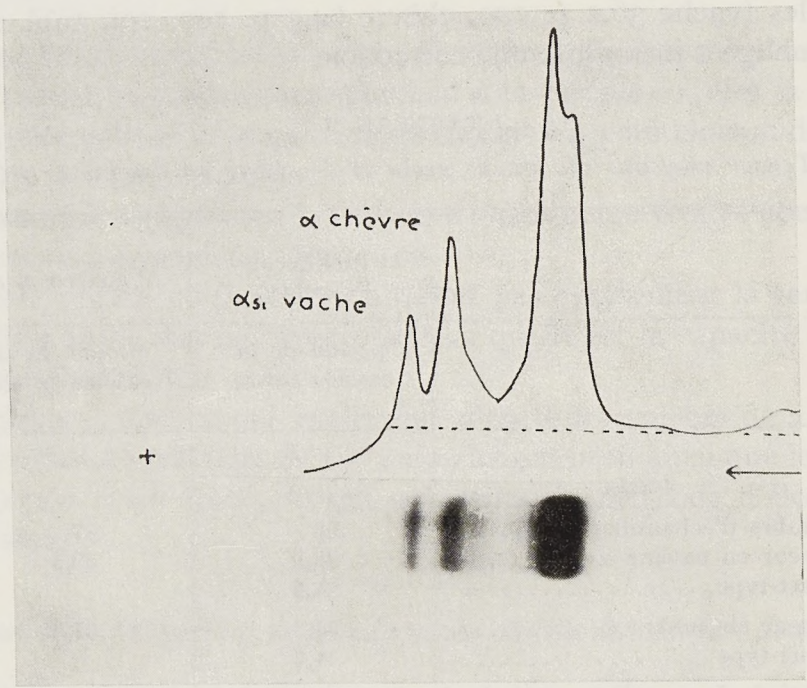


FIG. 4. — *Électrophorèse en gel de polyacrylamide de la fraction insoluble à pH 4,6 d'un fromage fabriqué à partir d'un mélange de laits*

La surface du pic α_{s1} de vache ($S\alpha_E$) est de 52 mm², la surface totale de l'ensemble des pics (SC_E) est égale à 800 mm² et la surface correspondant aux caséines β de chèvre et de vache en mélange ($S\alpha_E$) est de 485 mm².

La méthode de calcul 1 donne : $\frac{52/800}{38{,}9} \times 10^4 = 16{,}7$ p. 100

La méthode de calcul 2 donne : $r = 52/485 = 0{,}107$

$$\frac{226 \times 0{,}107}{1{,}355 + 0{,}107} = 16{,}6 \text{ p. } 100$$

Il est souhaitable, pour faciliter l'interprétation des électrophorèses, de faire migrer une solution de caséine de vache obtenue selon la technique décrite plus haut à côté de l'échantillon à analyser.

Nous avons observé que la vitesse de migration varie légèrement avec la concentration en protéines de l'échantillon, une concentration plus élevée entraînant une migration plus rapide. Il convient de tenir compte de cette observation lorsqu'on repère la caséine α_{s1} par rapport à la caséine de vache de référence.

Détermination de la concentration de la solution de caséine destinée à l'électrophorèse

La concentration de la solution de protéines destinée à l'électrophorèse doit se situer dans des limites telles que l'intensité de coloration des taches corresponde à une densité optique (DO) comprise entre 0,1 et 0,6. Dans cet intervalle la densité optique est proportionnelle à la concentration en protéines.

Pour déterminer les concentrations en protéines convenables, nous avons effectué des électrophorèses avec des solutions de caséine entière de vache à des concentrations variées et nous avons établi que les teneurs comprises entre 5 et 20 mg/ml étaient satisfaisantes. Les mêmes expériences effectuées avec la fraction caséine extraite d'un fromage nous ont conduits à des teneurs de 6 à 15 mg/ml.

Afin d'ajuster éventuellement la concentration des solutions avant d'en effectuer l'électrophorèse, nous avons dosé leur teneur en protéines en mesurant leur absorption à 280 nm.

Des essais préalables nous ont montré qu'une solution témoin contenant 5 à 20 mg/ml de caséine entière devait être diluée au 1/50 dans l'urée 7 M pour avoir une absorption mesurable ; la lecture effectuée dans ces conditions a donné pour ces deux concentrations, avec des cuves de 1 cm d'épaisseur, des DO de 0,095 et de 0,400. On devra donc s'attacher à ce que la DO d'une dilution au 1/50 de la préparation destinée à l'électrophorèse soit située entre 0,100 et 0,400.

La prise d'essai de 1,2 g de fromage indiquée dans la description des méthodes permet de se situer dans l'intervalle de DO correct pour la plupart des fromages analysés ; lorsque l'extrait sec du fromage est très élevé, il convient de diluer la préparation destinée à l'électrophorèse.

Des mesures effectuées sur des solutions obtenues à partir de deux fromages du commerce nous ont donné respectivement des DO de 0,275 et 0,310.

Application de l'électrophorèse au dosage de la quantité de lait de vache dans du lait et dans du fromage de chèvre

Mélanges de lait.

Dans le tableau 3, nous avons reporté les résultats obtenus avec des mélanges de lait pour lesquels nous indiquons la quantité de lait de vache additionnée au lait de chèvre (en volume p. 100 et en poids de protéine p. 100, les deux valeurs ne coïncidant pas nécessairement car les teneurs en protéines peuvent être plus élevées ou plus faibles dans l'un ou l'autre lait).

TABLEAU 3

Dosage du lait de vache en mélange avec du lait de chèvre en proportions connues

Proportion de lait de vache additionnée au lait de chèvre p. 100 V/V	Proportion de protéine de lait de vache du mélange p. 100 des protéines totales		
	Réelle	Mesurée selon la méthode de calcul	
		n° 1	n° 2
10	11	9	7
20	22	18	18
50	53	60	55
75	77	87	86
100	100	108	102

Fromages.

La détection et le dosage du lait de vache dans les fromages de chèvre ont été effectués sur des fabrications expérimentales. Dans le tableau 4 sont reportés les résultats de dosages effectués sur une série de fromages à coagulation lactique, type Chabichou, à différents stades de maturation; dans le tableau 5, on voit les résultats relatifs à des fromages de format semblable à celui du Camembert. La figure 5 montre l'électrophorèse de fromages de lait de chèvre pur et de fromages contenant 10 à 100 p. 100 de lait de vache.

Les résultats sont satisfaisants pour les fromages jusqu'à 15 à 20 jours de haloir, correspondant à des teneurs en azote soluble de 35 à 40 p. 100. Lorsque le fromage a atteint un degré de maturation important, la dégradation de la caséine se traduit par une moins bonne séparation des bandes et par la mise en évidence de nouvelles bandes par l'électrophorèse. Toutefois, nous avons remarqué qu'au cours de la maturation du fromage de chèvre, aucune bande n'apparaissait au niveau de la caséine α_{s1} de vache ; à cet endroit on observe seulement un très léger flou bleuté (fig. 6).

Nous avons fait également l'observation suivante : lorsqu'un fromage contient de la caséine de vache (fig. 7), celle-ci est encore visible lorsque le fromage a subi une maturation prolongée. On trouve en avant de la caséine de chèvre 2 bandes qui n'existent pas dans le fromage « pur chèvre » au même stade de maturation.

A ce stade de maturation, il est donc possible de dire, sans risque de se tromper, s'il y a eu ou non addition de lait de vache au lait de chèvre. Cependant, la détermination quantitative est peu précise comme on le voit sur les tableaux 4 et 5, dernière colonne.

Analyse des résultats. Comparaison des deux méthodes de calcul

On a effectué l'analyse des résultats obtenus avec 60 dosages par électrophorèse correspondant à 15 mélanges de laits et à 45 fromages de composition connue prélevés avant affinage, puis après 10 à 20 jours de haloir.

TABLEAU 4

Dosage du lait de vache dans les fromages de chèvre, type Chabichou, de composition connue

Proportion de lait de vache ajouté au lait de chèvre p. 100 V/V	Proportion de protéines de vache dans le lait de fabrication (en p. 100 de protéines totales)	*Proportion de protéines de lait de vache trouvée dans les fromages* (en p. 100 des protéines totales)							
		Avant la mise au haloir		Après un séjour au haloir de :					
				10 jours		20 jours		60 jours	
		Méthode de calcul		Méthode de calcul		Méthode de calcul		Méthode de calcul	
		1	2	1	2	1	2	1	2
10	11	9	8	13	11	10	9	3	4
20	22	22	21	27	23	16	16	4	5
50	53	64	62	71	63	53	56	26	29
75	77	88	85	105	84	79	86	62	64
100	100	130	102	125	108	104	99	103	96
Teneur moyenne en azote soluble (p. 100 azote total)		14,3		35,5		40,0		45,0	

TABLEAU 5

Dosage du lait de vache dans les fromages de chèvre, type Camembert, de composition connue

Proportion de lait de vache ajouté au lait de chèvre p. 100 V/V	Proportion de protéines de vache dans le lait de fabrication (en p. 100 de protéines totales)	*Proportion de protéines de lait de vache trouvée dans les fromages* (en p. 100 des protéines totales)							
		Avant la mise au haloir		Après un séjour au haloir de :					
				10 jours		20 jours		60 jours	
		Méthode de calcul		Méthode de calcul		Méthode de calcul		Méthode de calcul	
		1	2	1	2	1	2	1	2
10	11	7	9	6	5	5	5	2	2
20	22	18	21	23	21	9	8	22	10
50	53	50	53	64	63	53	51	62	26
75	77	93	78	83	31	75	73	72	58
100	100	95	98	103	103	77	84	101	77
Teneur moyenne en azote soluble (p. 100 azote total)		10,5		32,0		32,0		42,0	

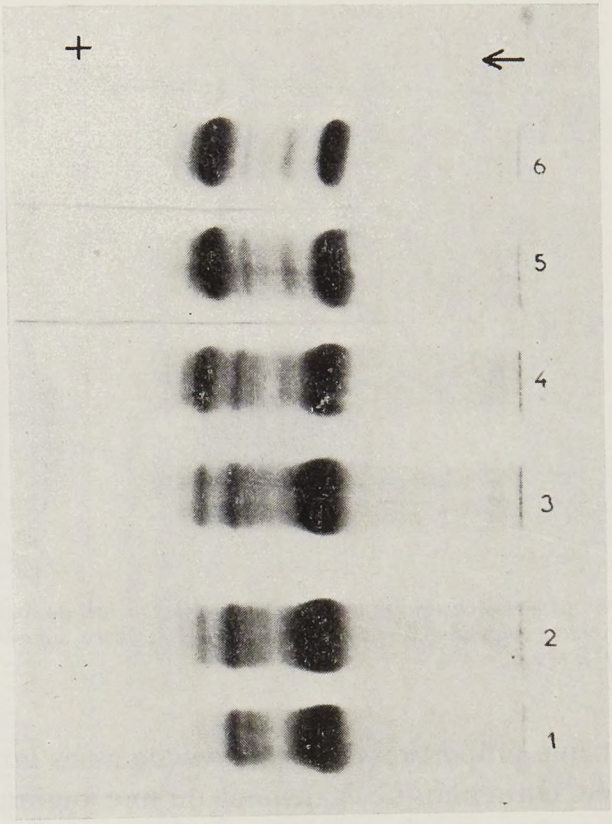


FIG. 5. — *Électrophorèse en gel de polyacrylamide de la fraction protéique insoluble à pH 4,6 de fromages Sainte-Maure ayant 21 jours d'affinage, préparés avec du lait de chèvre pur* (1) *et contenant du lait de vache dans les proportions de 10 p. 100* (2), *20 p. 100* (3), *50 p. 100* (4), *75 p. 100* (5) *et 100 p. 100* (6).

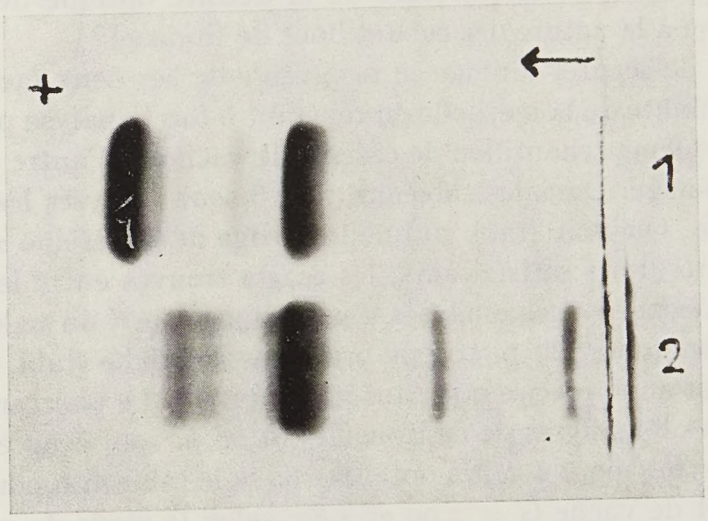


FIG. 6. — *Électrophorèse en gel de polyacrylamide de caséine entière de lait de vache* (1) *et de la fraction protéique insoluble à pH 4,6 d'un fromage de chèvre pur affiné un mois* (2) ; *implantation de l'échantillon sur le gel à 8 cm*

Les résultats ont été groupés selon la proportion de protéines de lait de vache contenue dans le mélange, soit 11, 22, 53, 77 et 100 p. 100.

Dans le tableau 6, on voit que, pour les mélanges contenant 11 et 22 p. 100 de protéines de lait de vache, l'écart type est relativement élevé et qu'il y a une grande

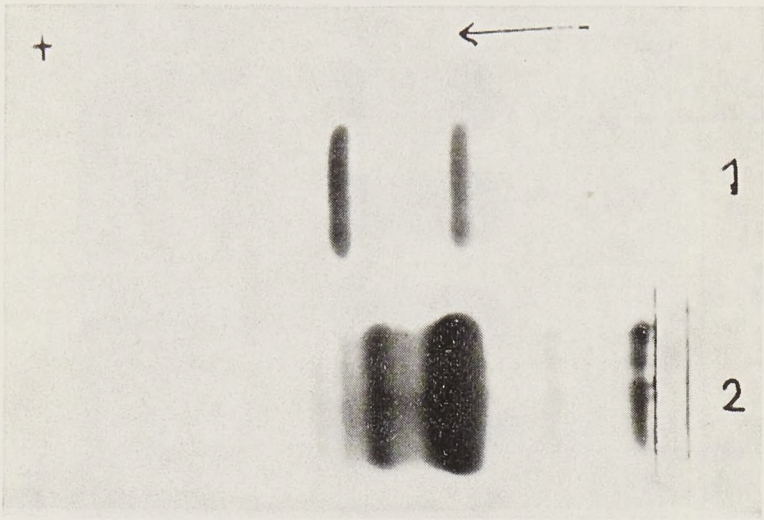


FIG. 7. — *Électrophorèse en gel de polyacrylamide de caséine entière de lait de vache* (1) *et de la fraction insoluble à pH 4,6 d'un fromage contenant 21 p. 100 de protéines de vache, affiné un mois* (2) ; *implantation de l'échantillon sur le gel à 8 cm.*

probabilité de trouver une proportion de lait de vache assez largement différente de celle réellement ajoutée. On remarque également qu'une augmentation de la proportion de lait de vache entraîne une augmentation de l'écart type.

Enfin, on voit nettement qu'au-delà de 20 p. 100 de lait de vache, la méthode n° 2 donne des résultats plus satisfaisants que la méthode n° 1.

L'écart élevé par rapport à la moyenne observée doit-il être attribué à la technique d'analyse (électrophorèse, mesure de la densité optique des taches et de la surface des pics) ou à la nature des échantillons de fromage ?

Pour essayer de séparer l'influence respective de ces deux facteurs, nous avons testé la reproductibilité de la méthode en répétant 8 fois l'analyse par électrophorèse, d'une part sur un même échantillon de caséine de vache et d'autre part sur un même échantillon de fromage. Dans les tableaux 7 et 8 sont analysés les résultats relatifs à cette expérience. On voit (tabl. 7) que le dosage de la caséine α_{s1} et β du lait de vache donne des résultats satisfaisants, les écarts trouvés entre les 8 analyses sont faibles. En ce qui concerne les analyses d'un fromage sorti du haloir après 15 jours d'affinage et qui contenait 21 p. 100 de protéines de vache (tabl. 8), la mesure des caséines α_{s1} et β est aussi précise que dans le cas du lait. Le pourcentage de protéines calculé à partir des 8 analyses de ce fromage (21,68 p. 100) a un écart type de 1,69. Si l'on compare cette valeur à celles obtenues dans le tableau 6 pour les échantillons à 22 p. 100 de lait de vache (s = 4,99 et 4,82, selon le mode de calcul), il apparaît que l'écart élevé noté pour les échantillons à 11 et 22 p. 100 de protéines de vache est dû pour une part (environ un tiers) à la technique de dosage et de mesure, le reste pouvant être attribué à l'échantillon.

TABLEAU 6

Analyse des résultats de 60 dosages par électrophorèse effectués sur 15 échantillons de lait et 45 échantillons de fromage contenant du lait de chèvre et de vache en proportions connues

Proportion de protéines de lait de vache additionnées dans le mélange (en p. 100 des protéines totales	n = 12 par type de mélange *Proportion de protéines de lait de vache calculée à partir de l'analyse par électrophorèse* (en p. 100 des protéines totales)							
	Méthode de calcul n° 1				Méthode de calcul n° 2			
	Valeurs			Écart-type s	Valeurs			Écart-type s
	Moyenne $\bar{x}$	Minima	Maxima		Moyenne $\bar{x}$	Minima	Maxima	
11	8,25	5	13	2,45	8,16	5	12	2,55
22	19,58	9	27	4,99	19,50	8	27	4,82
53	61,00	50	77	7,94	58,25	51	65	5,32
77	88,75	75	105	9,01	83,25	73	92	5,54
100	107,91	77	135	15,95	102,60	84	112	7,18

TABLEAU 7

Reproductibilité des résultats obtenus avec la méthode d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, étudiée sur une caséine de lait de vache analysée 8 fois

	Valeurs en p. 100 de caséine totale			Écart-type s
	Moyenne	Minima	Maxima	
Caséine α.....	46,25	44	49	1,83
Caséine β	40,18	38,5	41,5	0,99

TABLEAU 8

Reproductibilité des résultats obtenus avec la méthode d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, étudiée sur la fraction insoluble à pH 4,6 d'un fromage préparé avec un mélange de lait comprenant 21 p. 100 de protéines de lait de vache et 79 p. 100 de protéines de lait de chèvre.

L'analyse a été répétée 8 fois

	Valeur (en p. 100 de caséine totale)			Écart-type s
	Moyenne	Minima	Maxima	
Caséine α de vache	8,37	7,30	9,10	0,64
Caséine β de vache	58,10	54,20	60,00	1,91
Proportion calculée de protéines de lait de vache dans le mélange, en p. 100 de protéines totales	21,70	18,70	23,60	1,69

DISCUSSION

Nous avons basé la recherche et le dosage de l'addition frauduleuse de lait de vache dans le fromage de chèvre sur la différence de migration des caséines α de vache et de chèvre.

Le choix de cette protéine présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la caséine α_{s1} est un constituant majeur du lait de vache et l'addition de faibles quantités de ce lait peut être mise en évidence facilement. Par ailleurs, cette protéine n'est apparemment pas modifiée au cours du chauffage du lait et on la retrouve, que le lait de vache ait été chauffé ou non. Enfin, au cours de la fabrication de fromage, la totalité de la caséine α_{s1} est retenue dans le fromage et la méthode convient aussi bien à l'analyse de ce produit qu'à celle du lait.

La méthode décrite conduit à calculer un pourcentage de protéines de vache par rapport aux protéines totales ; ce résultat n'est pas directement transposable en volume de lait, d'abord en raison de la différence qui existe entre les proportions respectives de caséine par rapport aux protéines totales chez les laits de vache et de chèvre, ensuite du fait de la variabilité de la teneur en caséine (p. 100 d'un poids ou d'un volume de lait déterminé) dans chacune des espèces. Par conséquent, l'extrapolation des résultats concernant les pourcentages de protéines (de vache et de chèvre) à ceux concernant les volumes de lait (de vache et de chèvre) entraîne une imprécision supplémentaire. Cette remarque s'applique d'ailleurs aussi dans le cas où la matière grasse, au lieu des protéines, est prise en considération.

Même en se basant sur la proportion de protéines de vache, l'évaluation, à partir de l'analyse du fromage, du pourcentage de lait de vache additionné au lait de chèvre comporte une certaine imprécision. En effet, nous avons choisi, pour la teneur en caséine α_{s1} du lait de vache, un pourcentage moyen de 38,9 ; or la teneur réelle en α_{s1} du lait de vache introduit dans le mélange à examiner peut différer notablement de cette valeur puisque nous avons trouvé lors de notre enquête un écart type de 4,9. L'état de « maturation » de l'échantillon de fromage peut également influer sur le résultat de l'analyse. Enfin une autre source d'erreur réside dans la technique elle-même ; nous l'avons évaluée par une étude de répétabilité qui a montré qu'un tiers de la variation pouvait en effet être imputé à la technique.

Compte tenu de la marge d'erreur constatée, quelles sont les limites d'utilisation de la méthode proposée ?

Le décret du 20 octobre 1936 précise que « La dénomination « Fromage de chèvre » est réservée aux fromages de forme et de poids variables, préparés *exclusivement avec du lait de chèvre...* ».

Par conséquent, la mise en évidence, dans le fromage de chèvre, d'un des constituants du lait de vache, quelle qu'en soit la proportion, montrera qu'il y a eu fraude. Or, la sensibilité de la méthode décrite permet de détecter un minimum de caséine α_{s1} de vache correspondant à l'addition de 1,5 à 2 p. 100 de lait de vache au lait de chèvre avant la préparation des fromages. Il faut remarquer en outre que l'examen électrophorétique d'un fromage au lait de chèvre pur ne peut jamais conduire à une fausse interprétation, aucun produit de dégradation de la caséine de chèvre ne migrant en avant de la caséine α de chèvre.

L'appréciation qualitative de la fraude peut donc se faire sans équivoque, mais il est utile d'en fixer l'importance, même si les valeurs calculées diffèrent un peu, comme cela est probable, de la valeur réelle.

Nous proposons l'interprétation des résultats de la manière suivante : à partir du tableau 6 (méthode de calcul n° 2), nous avons calculé l'intervalle $x \pm \frac{2s}{\sqrt{n}}$ pour chaque groupe d'échantillons à même teneur en protéines de lait de vache ; nous avons ensuite construit le tableau 9. Sur celui-ci sont indiquées, dans la première colonne, les proportions v/v de lait de vache ajoutées au lait de chèvre lors de la fabrication du fromage ; dans la deuxième colonne sont indiquées les protéines de lait de vache (mesurées par détermination de l'azote Kjeldahl $\times$ 6,38) effectivement additionnées au lait de chèvre (en p. 100 des protéines totales) et dans la dernière colonne les proportions de protéines de lait de vache calculées d'après l'analyse électrophorétique.

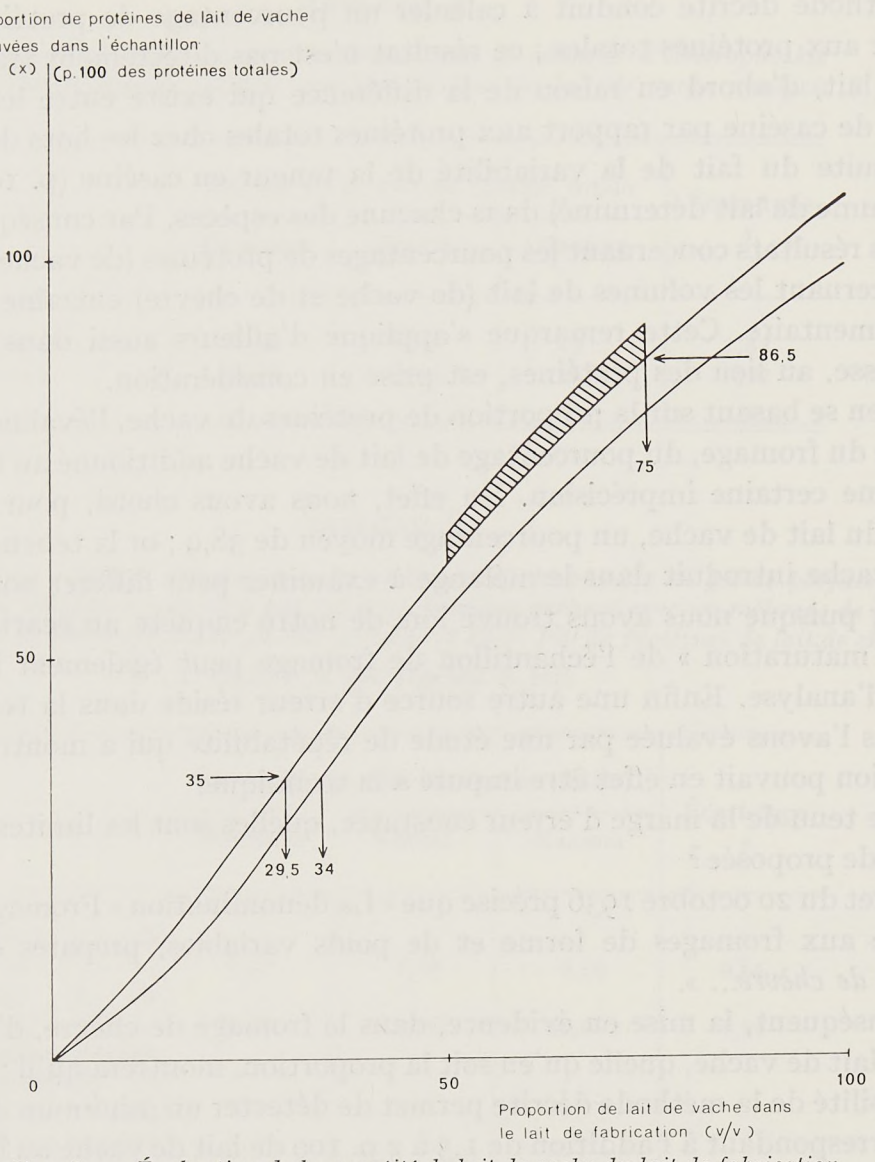


FIG. 8. — *Évaluation de la quantité de lait de vache du lait de fabrication en fonction du pourcentage de protéines de vache trouvé dans l'échantillon analysé.*
La partie hachurée correspond aux valeurs pour lesquelles il y a présomption de fraude dans le cas des fromages mi-chèvre.

TABLEAU 9

Évaluation de la quantité de lait de vache additionnée au lait de chèvre selon la proportion de protéine de lait de vache trouvée dans le fromage

Proportion V/V de lait de vache ajouté au lait de chèvre lors de la fabrication du fromage	Proportion de protéines de lait de vache additionnées dans le mélange (en p. 100 des protéines totales)	Proportion calculée d'après l'analyse par électrophorèse des protéines de lait de vache dans les protéines totales du fromage $\bar{x} \pm \frac{2\,s}{\sqrt{n}}$
10	11	6,70– 9,60
20	22	16,70– 22,30
50	53	55,20– 61,30
75	77	80,00– 86,45
100	100	98,50–106,80

Les données portées sur ce tableau ont ensuite été utilisées pour construire les courbes de la figure 8 sur laquelle on peut lire directement, selon la proportion, x, de protéines de lait de vache trouvée dans le fromage, la teneur probable de lait de vache ajoutée au lait de chèvre. Par exemple, si l'analyse de l'électrophorégramme donne $x = 35$ p. 100, cette valeur lue en ordonnée nous indique en abscisse que la fraude se situe entre 29,5 et 34 p. 100 de lait de vache mélangé au lait de chèvre.

La définition légale du fromage « mi-chèvre » indique que celui-ci est un fromage de lait de chèvre et de lait de vache contenant un minimum de 25 p. 100 de lait de chèvre, la proportion de lait de chèvre mis en œuvre devant être mentionnée.

La recherche de la fraude dans le cas des fromages mi-chèvre sera donc basée essentiellement sur les proportions déterminées par l'analyse. Le tableau 9 montre que, pour une proportion de lait de vache ajoutée au lait de chèvre en v/v, la proportion calculée de protéines de lait de vache aux protéines totales du lait varie dans des limites fixées par l'étude de nos résultats (tabl. 6) ; cette variation correspond à l'erreur moyenne.

Par conséquent, on ne peut considérer qu'il y a eu fraude, pour le fromage mi-chèvre, que lorsque la quantité calculée de protéines de lait de vache (en p. 100 des protéines totales du fromage) dépasse la valeur x la plus élevée du tableau 9, ou encore la courbe supérieure de la figure 8, soit par exemple 86,45 p. 100 pour le fromage pour lequel il est indiqué une composition de 25 p. 100 de lait de chèvre et de 75 p. 100 de lait de vache.

Cependant, entre ces valeurs déduites de l'expérience, que nous devons trouver dans 95 p. 100 des cas, et les valeurs maxima reportées sur le tableau 6, se situe une marge d'incertitude inhérente à la méthode. Nous l'avons représentée sur la figure 8 par une partie hachurée. Ceci nous amène à envisager l'interprétation de l'analyse des fromages mi-chèvre comme suit : on considérera qu'il y a présomption de fraude lorsque la valeur x sera située dans la partie hachurée du graphique ; il y aura fraude certaine lorsque x se trouvera au-dessus de la partie hachurée ; par exemple, considérons un fromage sur l'étiquette duquel est indiqué 25 p. 100 de lait de chèvre, soit 75 p. 100 de lait de vache ; si l'analyse électrophorétique donne $x = 88,5$ p. 100, l'intersection de 83,5 sur l'axe des ordonnées et de 75 sur l'axe des abscisses tombe dans la partie hachurée, donc il y a présomption de fraude ; si $x = 93$ p. 100, la fraude est certaine.

Nous avons vu que la méthode donne des résultats d'autant plus précis que les fromages analysés sont moins affinés ; ceci s'explique facilement puisque la maturation s'accompagne d'une lente dégradation de la caséine sur laquelle repose l'analyse.

Il est donc souhaitable que les prélèvements et dosages soient effectués à un stade de maturation aussi peu avancé que possible ; en fait, les conditions satisfaisantes sont pratiquement toujours remplies lorsque les fromages sont analysés dans l'état où ils sont mis en vente sur les marchés. La conservation des échantillons dans un congélateur à — 15°C (ou à une température plus basse) permet de différer l'analyse pendant un temps indéfini.

Il est particulièrement intéressant de noter que la faculté de conserver l'électrophorèse en gel de polyacrylamide séché permet d'en effectuer la lecture et l'interprétation plusieurs semaines ou plusieurs mois après la dessiccation du gel. On peut considérer le gel conservé comme un document sur lequel serait enregistrée l'image

de la composition du fromage à un moment donné ; cette image reste ensuite utilisable alors que le fromage s'altère et devient, lui, inutilisable pour une nouvelle analyse. L'électrophorégramme conservé peut alors, dans ce cas, être mis à la disposition des experts.

Pour conclure, on a vu que l'utilisation de l'électrophorèse en gel d'acrylamide présente des avantages certains : d'une part on peut détecter et doser aussi bien du lait de vache entier qu'écrémé et, d'autre part, la méthode est très sensible et sûre.

Cependant la précision n'est pas excellente et, comme dans toutes les méthodes déjà utilisées, elle est sous la dépendance de la variation de la composition du lait selon l'animal, la nourriture, la saison, etc.

On peut espérer améliorer la précision par une étude plus approfondie des constituants protéiques des laits de vache et de chèvre ainsi que par une amélioration des techniques utilisées.

C'est là un objectif que nous nous sommes fixé et nous poursuivons les recherches dans ce but.

Reçu pour publication en avril 1970.

REMERCIEMENTS

Nous remercions MM. Mocquot et Ribadeau-Dumas pour leurs suggestions et conseils tout au cours de ce travail et lors de la rédaction du manuscrit, ainsi que MM. Ricordeau et Garnier qui ont bien voulu nous guider sur un certain nombre de points au sujet desquels nous les avions consultés.

SUMMARY

DETECTION OF COW-MILK ADDED TO GOAT-MILK BY USE OF POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

The methods which have been used up till now to detect cow's milk added to goat's milk are based on the milk fat composition in each of those two animal species. Such methods are useless when skimmed cow's milk is added to goat's milk and only the proteins can be of use in such a case. The electrophoretic pattern of α_{s1}-casein from cow and from goat milks has been employed as a starting base. Cheese were prepared from mixed milk containing known quantities of cow's and goat's milk and samples were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis. From the results obtained, a standard curve has been drawn which enable to calculate the percentage of cow's milk used to prepare a cheese made from a mixture of both cow's and goat's milk.

RESUMEN

EMPLEO DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDO PARA HACER RESALTAR Y DOSIFICAR LA LECHE DE VACA ANADIDA A LA LECHE DE CABRA. APPLICACION EN EL CASO DE LOS QUESOS

Los métodos actuales de detección de una adición de leche de vaca a la leche de cabra, en los quesos, se fundan en la composición de la materia grasa de la leche de ambas especies animales. Por consiguiente, dichos métodos no permiten poner de manifiesto el fraude cuando la adición se

ha efectuado por medio de leche desnatada, en cuyo caso este estudio debe ser llevado a cabo en relación proteica. Por este motivo, hemos adoptado el método fundado en la diferencia de migración electroforética de las caseinas α_{s1} de la leche de vaca y de la leche de cabra.

Tomando como base quesos en cuya composición entran cantidades definidas de leche de vaca y de cabra, hemos estudiado la aplicación práctica de la electroforesis en gel de poliacrilamido para la dosificación y la detección de la leche de vaca añadida a la leche de cabra y, consecuentemente, proponemos un modelo de interpretación de los resultados construido a partir del análisis de los valores encontrados con motivo de dichos experimentos.

RIASSUNTO

IMPIEGO DELL'ELETTROFORESI IN GELO DI POLIACRILAMIDE PER SCOPRIRE E DOSARE IL LATTE DI VACCA AGGIUNTO AL LATTE DI CAPRA. APPLICAZIONE NEL CASO DEI FORMAGGI

I metodi attuali per scoprire l'aggiunta di latte di vacca al latte di capra nel formaggio si basano sulla differenza di composizione della materia grassa del latte di queste due specie animali. Essi non permettono pertento di constatare la frode quando è stato aggiunto del latte scremato e lo studio va fatto sulla frazione proteica. Abbiamo adottato quindi il metodo basato sulla differenza di migrazione elettroforetica delle caseine α_{s1} del latte di vacca e di quello di capra.

A partire da formaggi nella cui composizione si trovano delle quantità ben definite di latte di vacca e di capra, abbiamo studiato l'applicazione pratica dell' elettroforesi in gelo di poliacrilamide per rilevare e dosare il latte di vacca aggiunto a quello di capra e ci proponiamo un modello d'interpretazione dei risultati elaborato in funzione dell'analisi dei valori dati da tale esperimento.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Albonico F., Gianani L., Resmini P., Zanini A., 1966 *a*. Studi sui latti di diverse specie. IV. Contributo alla conoscenza della caseina di latte di capra. Proprietà elettroforetiche e contenuto di glucidi, di fosforo e di amminoacidi. *Industr. Latte, a* II, (3), 105-120.

Albonico F., Prati F., Resmini P., Zanini A., 1966 *b*. Studi sui latti di diverse specie. I. Contributo alla conoscenza della caseina di latte di vacca. Caratteristiche elettroforetiche e composizione in amminoacidi. *Riv. Latte*, A. XXI, 1-27.

Aschaffenburg R., 1964 *a*. Detection of cow's in goat's milk. *Annual Report of the National Institute For Research in Dairying*, 93.

Aschaffenburg R., 1964 *b*. Protein phenotyping by direct polyacrylamide-gel electrophoresis of whole milk. *Biochim. biophys. Acta*, **82**, 188-191.

Assenat L., 1967. Contribution à l'étude d'une méthode d'identification des laits et des fromages au moyen de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Lait*, **467**, 393-414 ; **433**, 496-502.

Chollet A., Camus A., 1937. Étude de la matière grasse du lait de chèvre, son application éventuelle à la recherche du mélange du lait de chèvre et du lait de vache. *Ann. Falsif.* Fraudes, **337**, 405-410.

Chollet A., Camus A., 1938. Étude de la matière grasse du lait de chèvre. *Ann. Falsif.* Fraudes, **353**, 224-225.

Hadland G., Solberg P., 1953. Détermination sérologique du lait de vache ajouté au lait de chèvre *XIII*e *Congrès International de Laiterie*. La Haye, **3**, 1287-90.

Hunziker H. G., Tarassuk N. P., 1965. Chromatographic evidence for heat-induced interaction of α-lactalbumin and β-lactoglobulin. *J. dairy Sci.*, **48**, 733-34.

Kalan E. B., Basch J.-J., 1966. Preparation of goat β-lactoglobulin. *J. dairy Sci.*, **49**, 406-9.

Kiddy C. A., Johnston J. O., Thompson M.-P., 1964. Genetic polymorphism in casein of cow's milk. I. Genetic control of α_{s1}-casein variation. *J. dairy Sci.*, **47**, 147-51.

Kuzdzal-Savoie Simonne, Kuzdzal W., 1959. La recherche du lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas du fromage. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 131-44.

Larson B. L., Rolleri G. D., 1955. Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. *J. dairy Sci.*, **38**, 351-60.

Lopez R. C., 1934. Différenciation des laits de chèvre et de vache. *Ann. Soc. Espanola Fis. Quim.* **32**, (315), 872-75. (in *Lait*, 1936, **160**, 1122).

ROWLAND S. J., 1938. The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. dairy Res.*, **9**, 42-46.

THOMPSON M. P., KIDDY C. A., 1964. Genetic polymorphism in casein of cow's milk. III. Isolation and properties of α_{s_1}-casein A, B and C. *J. dairy Sci.*, **47**, 626-32.

VAKALERIS D. G., PRICE W. V., 1959. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *J. dairy Sci.*, **42**, 264-76.

WAKE R. C., BALDWIN R. L., 1961. Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim. biophys. Acta*, **47**, 225-39.

ZITTLE C. A., THOMPSON M. P., CUSTER J. H., CERBULIS J., 1962. K-casein-β-lactoglobulin interaction in solution when heated. *J. dairy Sci.*, **45**, 807-10.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (2), 131-140.

ÉTUDE DE LA PRÉPARATION DE PROTOPLASTES CHEZ DEUX SOUCHES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIÆ* HANSEN

C. BIZEAU et Émilienne BIZEAU

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique,
École nationale supérieure agronomique
Centre de Recherches de Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

La préparation de « protoplastes » a été étudiée sur deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* ne différant que par un couple de gènes et cultivées sur glucose et sur éthanol. La souche mutante « colonie lisse » est plus sensible à l'action de l'enzyme d'escargot que la souche sauvage. Après culture sur éthanol, l'action de l'enzyme d'escargot, utilisée à doses convenables, a pour effet la lyse des cellules et non la formation de protoplastes chez la souche sauvage. Il est cependant possible d'obtenir des protoplastes dans ce cas en faisant précéder l'attaque d'un traitement au thioglycolate de sodium.

Les différences entre les deux souches sont dues à une différence dans la structure de la paroi contrôlée par le gène pl_5.

I. — INTRODUCTION

Depuis les travaux de GIAJA (1922), le suc gastrique de l'escargot *Helix pomatia* ou « enzyme d'escargot » a été souvent utilisé pour lyser la paroi des levures, soit en vue de l'obtention de spores à partir des asques, soit pour l'obtention de protoplastes. Ceux-ci peuvent être utilisés à leur tour pour des études physiologiques ou pour la préparation de particules infracellulaires. Les protoplastes étant lysés par de faibles variations de la pression osmotique du milieu, il est donc possible, par leur intermédiaire, d'obtenir le contenu cellulaire en diminuant au maximum le risque d'abîmer la structure de ces particules. Selon certains auteurs, le terme de protoplastes, utilisé pour désigner le résultat de l'attaque par l'enzyme d'escargot chez *Saccharomyces cerevisiae*, serait impropre. En effet, dans le cas de ce microorganisme, la paroi ne

serait pas totalement digérée et du matériel, tel que les cicatrices de bourgeons, resterait attaché à la membrane cytoplasmique (Ottolenghi, 1966 ; Bacon, Jones et Ottolenghi, 1969). Il serait donc préférable, selon ces auteurs, d'utiliser le terme de « sphéroplastes ».

D'un autre côté, l'étude de l'attaque enzymatique de la paroi est susceptible d'apporter des éclaircissements sur la structure de celle-ci.

C'est pourquoi nous donnons ici les résultats de la préparation de protoplastes à partir de deux souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Matériel biologique*

Le matériel biologique comprend les souches 4 et 183 (Galzy, 1964).

Ces deux souches sont isogéniques sauf pour un couple de gènes.

La souche 4 donne des colonies de type plissé sur des milieux solides où la source de carbone est l'acide lactique. Elle est PL_5PL_5. La souche 183 donne dans les mêmes conditions des colonies lisses. Elle est pl_5pl_5.

B. — *Cultures*

Les cultures sont conduites sur milieu liquide à base d'extrait de levure à la dose de 0,5 p. 100, amené à pH 4,5 par de l'acide tartrique. La source de carbone est soit du glucose à la dose de 0,5 p. 100, soit de l'éthanol à la dose de 1 p. 100. Les cultures sont faites dans des erlenmeyers remplis au 1/10 de leur volume et agités constamment à la température du laboratoire. Elles proviennent d'un inoculum obtenu sur le même milieu. L'inoculum est prélevé en phase exponentielle et l'ensemencement réalisé de telle façon que la culture contienne au moment de l'expérience 50 à $70 \cdot 10^6$ cellules/ml. Comme on le sait, le stade de la culture est une condition très importante de l'attaque de la paroi par l'enzyme d'escargot. Pour toutes les expériences décrites ici, les levures ont donc été prélevées rigoureusement au même stade, c'est-à-dire pendant la phase exponentielle de croissance.

C. — *Production des « protoplastes »*

1. *Sans action du thioglycolate.*

La méthode de préparation adoptée est celle d'Ohnishi *et al.* (1964). Les cellules, séparées du milieu de culture par centrifugation, sont lavées 2 fois avec un tampon tris-maléate pH 5,7, 10 mM., contenant de l'EDTA à la dose de 0,1 mM. et du sorbitol à la dose de 1,3 M. On ajoute de l'enzyme d'escargot additionnée de tampon tris-maléate et de sorbitol de façon à réaliser une concentration en sorbitol 1,3 M.

L'enzyme utilisée est le suc d'*Helix pomatia* de la firme « Industrie biologique française ». Cette préparation est très complexe et peut être variable, c'est pourquoi, dans ce qui va suivre, le même lot d'enzyme ou le même mélange de lots différents a été utilisé pour chaque expérience.

2. *Après action du thioglycolate.*

La préparation des protoplastes est améliorée par l'action des composés possédant des groupements — SH libres. On a ainsi préconisé la dimercaptoéthylamine (Ruiz-Amil, 1966), le mercaptoéthanol (Davies et Elvin, 1964) et la cystéine qui est sans action sur nos souches.

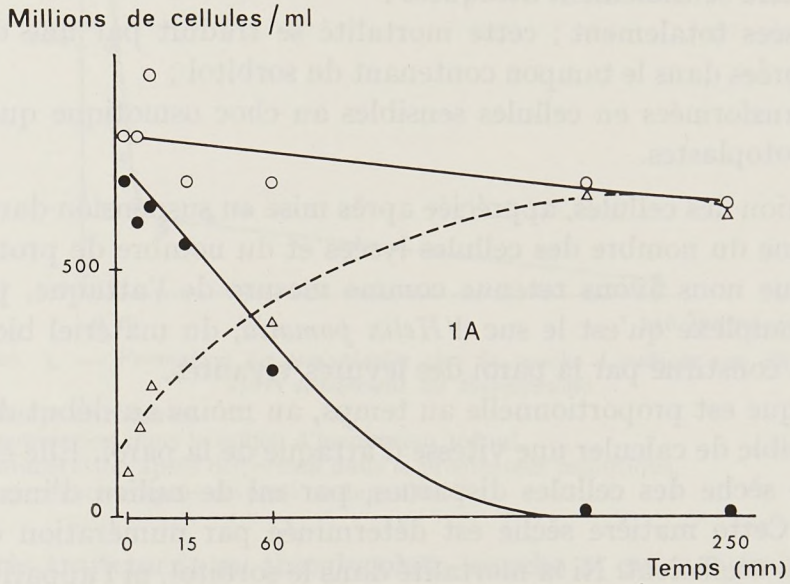
En accord avec Kovack *et al.* (1968) nous avons utilisé le thioglycolate de sodium.

Les cellules sont séparées du milieu de culture par centrifugation et lavées 1 fois au tampon phosphate pH 4,5 ; le culot obtenu est mis en suspension dans une solution fraîchement préparée contenant : acide thioglycolique 0,5 M, tris 0,1 M, EDTA 1 mM ; le pH est réglé à 9,3 avec de la soude.

On utilise 20 ml de cette solution par gramme de matière sèche contenue dans le culot. Le traitement dure trente minutes à 26°C. Les levures sont alors recueillies par centrifugation et lavées 2 fois au tampon tris-maléate pH 5,7. L'attaque par l'enzyme est conduite comme il a été décrit précédemment.

3. *Étude de la formation de protoplastes.*

L'évolution des levures soumises à l'action de l'enzyme est suivie par numération à l'hématimètre à intervalles de temps réguliers. Une dilution par 100 est faite dans le tampon de lavage, ce qui permet d'apprécier la mortalité, par différence avec la population de départ. Une deuxième dilution par 100 est faite simultanément dans l'eau distillée. Les levures sensibles au choc osmotique sont considérées comme des protoplastes. Leur nombre est donné par la différence entre les deux comptages. A l'examen microscopique ils se présentent comme des sphères homogènes.



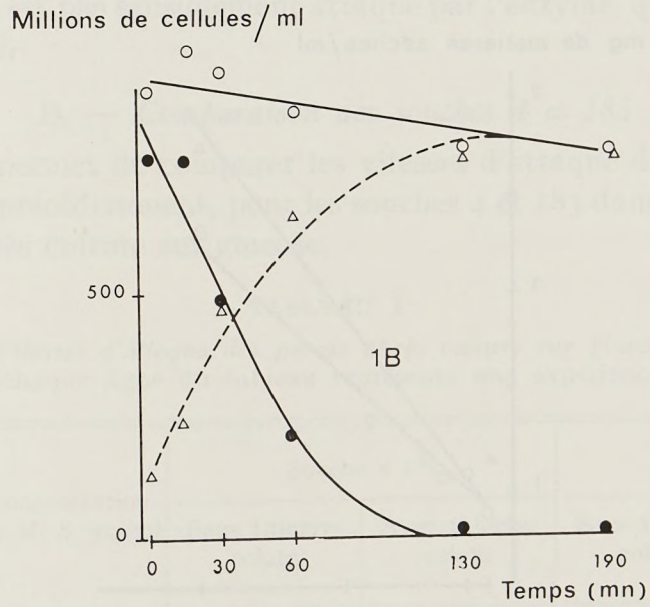


FIG. 1. — *Formation de protoplastes après culture sur glucose et traitement au thioglycolate*

Abscisse : temps en minute.
Ordonnée : population en millions de cellules/ml.
○ : population en présence de protecteur osmotique.
● : population en absence de protecteur osmotique.
Δ : protoplastes.
1 A Souche « 4 » 1 B Souche « 183 ».

III. — RÉSULTATS

A. — *Étude de l'attaque par l'enzyme*

Les figures 1 A et 1 B montrent le déroulement d'une expérience effectuée avec les souches « 4 » et « 183 ». Les levures peuvent subir trois sorts différents, sous l'influence de l'enzyme d'escargot :

— ne pas être sensiblement attaquées ;

— être lysées totalement ; cette mortalité se traduit par une disparition des cellules dénombrées dans le tampon contenant du sorbitol ;

— être transformées en cellules sensibles au choc osmotique que nous assimilerons à des protoplastes.

La population des cellules, appréciée après mise en suspension dans l'eau, évolue comme la somme du nombre des cellules lysées et du nombre de protoplastes. C'est cette somme que nous avons retenue comme mesure de l'attaque, par la mixture enzymatique complexe qu'est le suc d'*Helix pomatia*, du matériel biologique également complexe constitué par la paroi des levures vivantes.

Cette attaque est proportionnelle au temps, au moins au début de l'expérience. Il est ainsi possible de calculer une vitesse d'attaque de la paroi. Elle est exprimée en mg de matière sèche des cellules disparues, par ml de milieu d'incubation et par heure (fig. 2). Cette matière sèche est déterminée par numération des cellules et application d'un coefficient. Ni la mortalité dans le sorbitol, ni l'apparition des protoplastes ne peuvent être utilisées seules comme reflet de l'attaque enzymatique, car, ainsi qu'on le verra plus loin, il peut y avoir attaque sans formation de protoplastes et si la formation de protoplastes s'accompagne toujours d'une certaine mortalité,

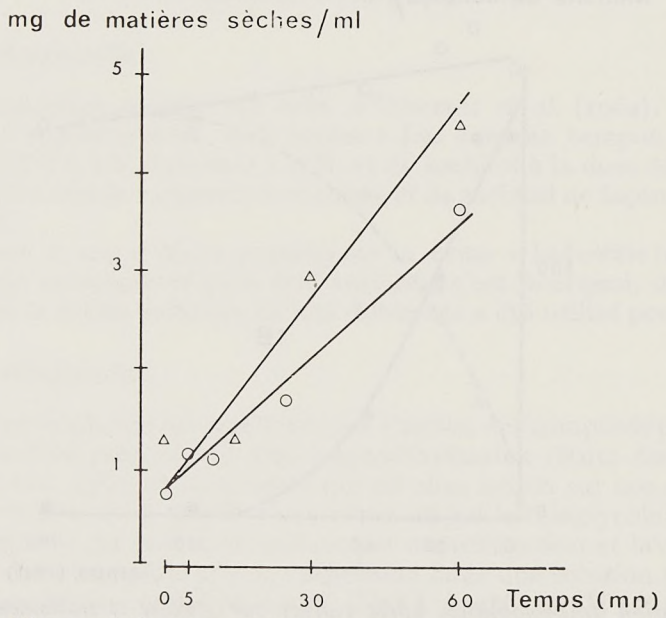


FIG. 2. — *Mesure de la vitesse d'attaque de la paroi par l'enzyme d'escargot, après culture sur glucose et traitement au thioglycolate*

Abscisse : temps en minute.
Ordonnée : levures lysées en absence de protecteur osmotique, en mg de matière sèche/ml.
○ : Souche « 4 ».
Δ : Souche « 183 ».

celle-ci peut être plus ou moins importante selon les conditions expérimentales. Dans certains cas l'attaque paraît se dérouler en deux temps (fig. 3). Dans une première phase l'attaque est rapide, dans une deuxième elle est beaucoup plus lente. Ceci se produit uniquement avec les levures cultivées sur éthanol, lorsque l'attaque

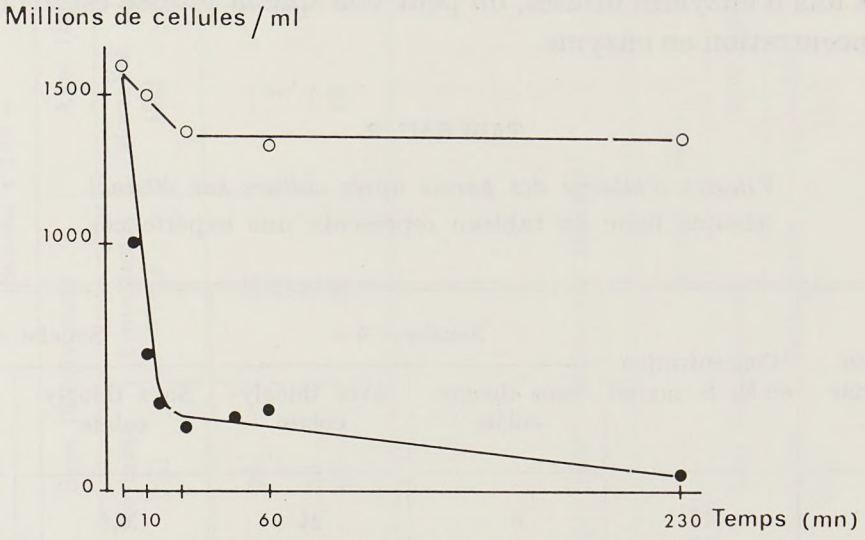


FIG. 3. — *Formation de protoplastes chez la souche 4 cultivée sur éthanol après traitement au thioglycolate*

Abscisse : temps en minute.
Ordonnée : population dans le milieu d'incubation 10^6/ml.
○ : numération après dispersion dans le proctecteur osmotique.
● : numération après dispersion dans l'eau.

est menée après traitement au thioglycolate (souche 4) ou sans traitement au thioglycolate (souche 183). Tout se passe comme si, dans ce cas, on avait deux populations de levures en mélange, chacune dans un état physiologique différent. Enfin, même après traitement au thioglycolate, il existe toujours un faible pourcentage de la suspension qui n'est pas sensiblement attaqué par l'enzyme, quel que soit le temps de contact avec lui.

B. — *Comparaison des souches 4 et 183*

Le tableau I permet de comparer les vitesses d'attaque de la paroi, calculées comme il a été dit précédemment, pour les souches 4 et 183 dans diverses conditions expérimentales après culture sur glucose.

TABLEAU I

Vitesses d'attaque des parois après culture sur glucose
(chaque ligne du tableau représente une expérience)

Concentration p. 100 en enzyme	Concentration en M. S. mg/ml	Souche « 4 »		Souche « 183 »	
		Sans thioglycolate	Avec thioglycolate	Sans thioglycolate	Avec thioglycolate
10	6	0,3	—	0,6	—
10	15	0	64	3,6	210
50	35	2,5	—	3	—
50	57	10	29	14	41

Le tableau 2 permet les mêmes comparaisons après culture sur éthanol. Dans tous les cas, le thioglycolate augmente considérablement la vitesse d'attaque. Il semble même, d'après les figures 1 et 2, qu'un certain nombre de levures peuvent devenir sensibles au choc osmotique sous la seule action de ce corps. Malgré l'hétérogénéité des lots d'enzymes utilisés, on peut voir que la vitesse est accrue lorsqu'on accroît la concentration en enzyme.

TABLEAU 2

Vitesses d'attaque des parois après culture sur éthanol
(chaque ligne du tableau représente une expérience)

Concentration p. 100 en enzyme	Concentration en M. S. mg/ml	Souche « 4 »		Souche « 183 »	
		Sans thioglycolate	Avec thioglycolate	Sans thioglycolate	Avec thioglycolate
10	17	0	24	0,6	160
10	17	0	—	1,4	—
50	17	1,8	—	6	—

Les deux tableaux montrent que la vitesse d'attaque de la paroi est toujours plus élevée chez la souche « 183 » que chez la souche « 4 », dans les mêmes conditions expérimentales. Cette différence entre les deux souches est parfois peu nette, surtout lorsque l'on utilise de fortes concentrations en enzyme. Elle est beaucoup plus nette après culture sur éthanol.

Les tableaux 3 et 4 donnent les résultats des mêmes expériences en ce qui concerne la fabrication des protoplastes. Les résultats sont jugés, soit en fin d'attaque lorsqu'il s'agit d'expérience avec traitement au thioglycolate, soit au bout de 20 h lorsqu'il s'agit d'expérience sans traitement au thioglycolate. On peut voir sur ces tableaux que les proportions de protoplastes obtenues sont semblables pour les deux souches.

Il y a cependant une exception : la souche 4 après culture sur éthanol ne donne pas, ou très peu, de protoplastes, si le traitement au thioglycolate n'est pas fait. Cependant il peut y avoir attaque de la paroi.

IV. — DISCUSSION

Ces expériences permettent de préciser les meilleures conditions expérimentales pour obtenir des protoplastes avec les deux souches que nous avons utilisées. L'emploi du thioglycolate améliore, non seulement la vitesse de formation des protoplastes, mais aussi la proportion de protoplastes recueillis. Quelles que soient les conditions expérimentales, la paroi des cellules de la souche « 183 » est toujours attaquée plus vite que celle des cellules de la souche « 4 ». La différence est particulièrement nette après culture sur éthanol. On sait que dans ce cas le volume moyen des cellules de

TABLEAU 3

Résultat de l'attaque des parois cellulaires par l'enzyme d'escargot après culture sur glucose

Concentration p. 100 en enzyme	Concentration en M. S. mg/ml	Souche « 4 »				Souche « 183 »			
		Sans thioglycolate		Avec thioglycolate		Sans thioglycolate		Avec thioglycolate	
		Mortalité (%)	Protoplastes (%)	Mortalité (%)	Protoplastes (%)	Mortalité (%)	Protoplastes (%)	Mortalité (%)	Protoplastes (%)
10	6	48	52	—	—	37	43	—	—
10	15	0	0	21	78	1	73	7	87
50	35	35	61	—	—	23	71	—	—
50	57	68	20	13	86	65	25	13	86

TABLEAU 4

Résultats de l'attaque des parois cellulaires par l'enzyme d'escargot après culture sur éthanol

Concentration p. 100 en enzyme	Concentration en M. S. mg/ml	Souche « 4 »				Souche « 183 »			
		Sans thioglycolate		Avec thioglycolate		Sans thioglycolate		Avec thioglycolate	
		Mortalité (%)	Protoplastes (%)	Mortalité (%)	Protoplastes (%)	Mortalité (%)	Protoplastes (%)	Mortalité (%)	Protoplastes (%)
10	17	10	0	2	85	67	29	28	72
10	17	0	0	—	—	28	40	—	—
50	17	85	11	—	—	56	38	—	—

la souche « 4 » est double de celui des cellules de la souche « 183 » (BIZEAU et GALZY, 1966). Il s'ensuit que, à quantité de matière sèche égale, la surface externe des cellules de la souche « 183 » est environ 1,2 fois celle des cellules de la souche « 4 ». Cette différence est trop faible pour expliquer l'attaque plus rapide des parois de la souche « 183 ». La différence observée dans les vitesses d'attaque s'explique plutôt par une différence de composition de la paroi. Celle-ci est attestée d'ailleurs par le fait qu'il existe chez la souche « 4 » au moins un site antigénique de plus que dans la souche « 183 » (BIZEAU, *et al.*, 1969).

La culture sur éthanol a pour effet de rendre l'attaque plus difficile pour les deux souches. Elle a pour la souche « 4 » un effet supplémentaire. Dans ce cas il n'est pratiquement plus possible d'obtenir des protoplastes avec la souche « 4 », alors même qu'un grand nombre de cellules sont lysées. Il semble donc que, pour cette souche, on ne puisse guère dissoudre la paroi sans léser également la membrane cytoplasmique lorsque la levure est cultivée sur éthanol. Le thioglycolate supprime ce phénomène.

La paroi de la levure est formée de protéines, de glucanes et de mannanes. D'après LAMPEN (1968), il existe dans cette paroi deux zones : une zone superficielle de mannanes, une zone profonde de glucanes, reliées par une couche de protéines ; ces protéines sont elles-mêmes réunies par des ponts disulfure. Tous les auteurs, en particulier ANDERSON (1966), sont d'accord pour attribuer l'action du thioglycolate et de ses homologues à une rupture des ponts disulfure entre les protéines, et pour attribuer la résistance des cellules âgées à la multiplication des ponts disulfure. L'attaque enzymatique proprement dite porterait sur les glucanes qui seraient dégradés totalement, alors que les mannanes sont solubilisés sans être dégradés. Le suc d'*Helix* ne semble pas contenir d'enzymes protéolytiques (ANDERSON, 1966).

Il est prématuré cependant de conclure que la différence de composition de la paroi des deux souches porte sur les glucanes, en particulier parce que ceux-ci sont censés ne pas avoir de propriétés antigéniques chez certaines levures, *Candida albicans* notamment (FUKAZAWA et TSUCHIYA, 1969). Une étude est en cours pour isoler le composé responsable des propriétés antigéniques de la souche « 4 ».

V. — CONCLUSIONS

L'étude de la fabrication de protoplastes chez les souches « 4 » et « 183 », montre des différences de comportement entre les deux souches en relation avec une différence de composition de la paroi cellulaire, mise en évidence précédemment.

SUMMARY

STUDY OF THE PREPARATION OF PROTOPLASTS IN TWO STRAINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HANSEN

The preparation of « protoplasts » has been studied on two strains of *Saccharomyces cerevisiae* differing only by a couple of genes and cultivated on glucose and ethanol. The mutant strain « smooth colony » is more sensitive to the action of the snail enzyme than the wild colony. After

ethanol culture the effect of the action of the snail enzyme, used in suitable doses, is the lyse of the cells and not the formation of protoplasts in the wild strain. It is however possible to obtain protoplasts in this case by preceding the attack with a sodium thioglycolate treatment.

The differences between the two strains are due to a structural difference of the cell wall controlled by the pl_5 gene.

RESUMEN

ESTUDIO DE LA PREPARACION DE PROTOPLASTOS CON DOS CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HANSEN

La preparacion de « protoplastos » ha sido estudiada utilizando dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que difieren solamente por un par de genes y que han sido cultivadas sobre glucosa y sobre etanol.

La cepa mutante « colonia lisa » es mas sensible que la salvaje a la accion de la enzima de caracol.

En el caso de la cepa salvaje, luego de un cultivo sobre etanol la utilización de la enzima de caracol a dosis adecuadas tiene por efecto la lisis de las células y no la formacion de protoplastos

Sin embargo, aun en este caso es posible obtener protoplastos haciendo un tratamiento previo con thioglycolato de sodio.

El comportamiento distinto de estas dos cepas es debido a una diferencia de estructura de la pared controlada por el gene pl_5.

RIASSUNTO

STUDIO DELLA PREPARAZIONI DI PROTOPLASTI IN DUE CEPPI DI *SACCAROMICETI CEREVISIAE* HANSEN

La preparazione di « protoplasti » è stata studiata su due ceppi di *Saccaromiceti cerevisiae* che differiscono solo per una coppia di geni e coltivati su glucosio e su etanolo. Il ceppo che arresta la fermentazione alcolica « colonia liscia » à più sensibile del ceppo selvatico all'azione dell'enzima di lumaca. Dopo coltura su etanolo, l'azione dell'enzima di lumaca, impiegato in dose opportune, ha come effeto la lisi delle cellule e non la formazione di protoplasti nel ceppo selvatico. Tuttavia è possibile ottenere dei protoplasti in questo caso, facendo precedere l'attacco da un trattamento al tioglicolato di sodio.

Le differenze tra i due ceppi sono dovuti a una differenza nella structura della parete controllata dal gene pl_5.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSON F. B., 1966. Some aspect of protoplast formation and yeast cell wall structure. *Abhandlungen der Deutsch. Akad. der Wissenschaften Zu Berlin*, n° 6.

BACON J. S. D., JONES D., OTTOLENGHI P., 1969. Residues in yeast protoplast preparation. *J. Bacteriol.*, **99** (3), 885-887.

BIZEAU C., GALZY P., 1966. Influence de la mutation du gène PL_5 vers pl_5 sur le volume cellulaire d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN dans diverses conditions expérimentales. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, série D, 116-119.

BIZEAU C., GALZY P., BASTIDE J. M., Madeleine BASTIDE, 1969. Mise en évidence d'une différence antigénique contrôlée par un gène de la série *pl* et localisée dans la paroi chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *C. R. Acad. Sci.*, **269**, série D, 1 632-1634.

DAVIES, ELVIN, 1964. *Biochem, J.*, **3** ; d'après ANDERSON, 1968.

FUKAZAWA Y., TSUCHIYA T., 1969. Immunological structure and specificity of the cell wall of yeast. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **35**, Yeast Symposium.

GALZY P., 1964. Étude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Ann. Technol. agric.*, **13** (2), 175.

GIAJA J., 1922. *C. R. Soc. Biol.*, **86**, 708 ; d'après SOMLO M. : *Étude physiologique des trois lacticodéshydrogénases de la levure.* Thèse, Paris, 1967.

KOVACK L., BEDMAN H., GREKSAK M., 1968. Oxydative phosphorylation in yeast. I. Isolation and properties of phosphorylating mitochondria from stationnary phase cells. *Biochim. biophys. Acta.*, (153), 32-42.

LAPMEN J. O., 1968. External enzymes of yeast : their nature and formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **34**, 118.

OHNISHI T., HAGIHARA B., 1964. Yeast mitochondria preparation and some properties of intact yeast mitochondria. *Inform. Exchange*, (407).

OTTOLENGHI P., 1966. Do yeast form true protoplasts ? *C. R. Lab. Carlsberg*, **35** (15), 363-368.

RUIZ AMIL F., MEDRARO L., LOSADA M., 1966. Cellular distribution of yeast pyruvate decarboxylase and its induction by glucose. *Arch. Mikrobiol.*, **45**, 46-53.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (2), 141-154.

ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DE L'ACIDE L-MALIQUE PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES NON PROLIFÉRANTES ISOLÉES DES VINS

Suzanne LAFON-LAFOURCADE
avec la collaboration technique de Annick JOYEUX

Institut d'Œnologie de Bordeaux, 33 - Talence
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

La dégradation de l'acide L-malique par un certain nombre de bactéries lactiques isolées des vins, lactobacilles et coques, est étudiée dans un milieu synthétique dépourvu de substances azotées et ne comportant d'autres sources hydrocarbonées que l'acide L-malique, le plus souvent avec une importante masse bactérienne (1 à 5 g par l.) et dans un temps relativement court (5 à 48 h). Ces conditions interdisant pratiquement toute prolifération des cellules, leur activité vis-à-vis du substrat peut être imputée, en première approximation, au potentiel enzymatique malique qu'elles détiennent.

Les conditions optimales de la réaction de dégradation de l'acide L-malique ont été déterminées en ce qui concerne différents facteurs : la qualité constitutive ou inductible du complexe enzymatique « malique » des bactéries, le pH (entre 3,5 et 4), la température (30°C), le taux d'anhydride sulfureux combiné (inférieur à 20 mg par l.), la concentration en alcool (selon les bactéries, de 11 à 14°).

Ce travail portant sur un grand nombre de souches met en relief certaines d'entre elles pour leur plus grande activité ou leur tolérance aux facteurs défavorables. Il permet en outre d'envisager une technique plus efficace d'induction de la fermentation malolactique dans les vins.

INTRODUCTION

Les essais d'induction de la fermentation malolactique dans les vins ont été réalisés jusqu'ici au moyen d'ensemencements bactériens relativement faibles, dans le but d'obtenir la multiplication des bactéries. De nombreux obstacles s'opposent à cette multiplication dans un milieu comme le vin, riche en alcool, acide, souvent sulfité, relativement pauvre en substances azotées, en matières minérales. Nous avons déjà précisé quelques règles fixant certaines conditions dans lesquelles il convient de se placer pour obtenir le meilleur pourcentage de réussite (LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1968). Mais dans la pratique il est souvent difficile de réunir les conditions optimales qui permettent une croissance bactérienne dans le vin ; d'autre part cer-

tains facteurs nous sont inconnus et certaines carences ne peuvent être détectées ni d'ailleurs corrigées. En fait, l'ensemencement direct d'un vin n'est suivi qu'assez rarement, dans des délais convenables, d'un développement bactérien et d'une fermentation malolactique.

Lorsqu'on étudie l'évolution d'une population bactérienne introduite expérimentalement dans un vin, on observe, dans les premières heures, une chute brutale du nombre de cellules vivantes, puis une régression plus graduelle, suivie ou non, après quelques jours, d'une multiplication. Mais cette régression du nombre de bactéries vivantes peut s'accompagner d'une dégradation partielle de l'acide L-malique qui se poursuit même en l'absence quasi totale de bactéries vivantes. Dans ce cas, c'est le complexe enzymatique de la dégradation de l'acide malique apporté par les bactéries qui agit. De semblables observations avaient été faites par RADLER (1957) sur moût de raisin ; les résultats furent négatifs dans le vin, la bactérie utilisée par cet auteur étant très sensible à l'alcool. Une étude enzymatique de la transformation de l'acide malique a encore été conduite par JERCHEL *et al.* (1956).

Ces observations nous ont amené à entreprendre l'étude de la fermentation de l'acide L-malique au moyen de cellules bactériennes non proliférantes considérées alors non plus comme un levain, mais comme le support d'un certain potentiel enzymatique, agent de cette fermentation.

Nous nous sommes attaché à préciser les points suivants :

1° Sélection des souches en fonction de l'activité de leur complexe enzymatique et de la nature de celui-ci.

2° Obtention du stock enzymatique optimum pour une souche donnée en fonction du mode de préculture.

3° Étude des facteurs susceptibles d'agir sur la réaction enzymatique pour la favoriser ou au contraire pour l'inhiber.

TECHNIQUES OPÉRATOIRES

Chaque essai comporte deux phases : l'obtention d'une masse bactérienne dans un « milieu de préculture » et l'étude de l'activité de ces bactéries vis-à-vis de l'acide L-malique en fonction des divers facteurs, dans un « milieu d'expérimentation ».

Milieux de préculture

Les bactéries sont le plus souvent cultivées sur moût de raisin dilué deux fois et enrichi de 5 g d'extrait de levure par litre. Selon les besoins de l'expérimentation, nous avons utilisé aussi le milieu de Carr et le milieu MRS légèrement modifié.

Milieu de Carr en g par litre		Milieu MRS modifié en g par litre	
Caséine hydrolysée	5	Tryptone Difco	10
Extrait de levure Difco	4	Extrait de viande	10
Phosphate acide de potassium	0,55	Extrait de levure	5
Chlorure de potassium	0,425	Phosphate acide de potassium	2
Chlorure de calcium	0,125	Acétate de sodium	5
Sulfate de magnésium	0,125	Sulfate d'ammonium	2
Perchlorure de fer	0,002 5	Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,002 5	Sulfate de manganèse	0,05
Glucose	40	Acide citrique	2
Acide DL-malique	5	Glucose, fructose, saccharose, arabinose, xylose	2 de chaque
		Acide DL-malique	5
pH ajusté à 4,8		pH ajusté à 4,8	

Milieu d'expérimentation.

Afin d'éviter une interférence de la croissance bactérienne sur la dégradation enzymatique, nous avons opéré dans un milieu synthétique simple constitué par un tampon phosphate enrichi en oligo-éléments et ne comportant absolument aucune autre substance que l'acide L-malique. Une série d'essais, relatés plus loin, nous a amené à fixer le pH à 4,0.

Phosphate acide de potassium	2 g par litre
Sulfate de magnésium	0,125 g "
Sulfate de manganèse	0,025 g "
Acide L-malique	50 à 70 méq.
pH ajusté à 4,0	

Protocole d'essai

Le milieu d'expérimentation est réparti dans des tubes à essai à raison de 10 ml par tube et stérilisé à 115°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, on ensemence sous forme d'une suspension avec des poids déterminés de bactéries lavées recueillies à partir des milieux de préculture par centrifugation à 9 000 tours par minute à 0°C et on porte à incubation à 30°C. Des dosages d'acidité totale sont effectués à intervalles réguliers après élimination du gaz carbonique par agitation sous vide. La différence d'acidité totale dans le milieu de base avant et après l'addition de l'acide L-malique permet de calculer la teneur exacte du milieu en cet acide. La disparition de la moitié de ce taux d'acidité dans le milieu d'expérimentation signifie une fermentation malo-lactique complète.

Nos essais ont comporté deux variantes : d'une part l'utilisation de 20 à 100 mg de bactéries fraîches par litre, doses nécessitant des temps de réaction de 4 à 20 jours ; d'autre part l'utilisation de 1 à 5 g, soit 50 fois plus, doses qui ramènent la durée des observations à 5 ou 24 heures. Dans le premier cas, l'autolyse bactérienne intervient, des réactions d'adaptation, d'induction enzymatique ne sont pas impossibles malgré la pauvreté du milieu ; dans le second cas, on se rapproche davantage d'un véritable dosage d'une activité enzymatique « malique ».

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Sélection des souches en fonction de leur activité enzymatique

Les bactéries lactiques transforment l'acide L-malique en acide L (+) lactique grâce à leur activité enzymatique. La nature de cette activité est dite « constitutive »

si elle fait partie intégrante, d'une manière permanente, de la cellule bactérienne; elle est dite « inductible » si elle est seulement induite par préculture du microorganisme sur un milieu contenant de l'acide L-malique.

Pour présenter un intérêt technologique et servir dans les essais d'ensemencement, les bactéries doivent répondre à deux critères fondamentaux : posséder une activité enzymatique de nature constitutive, qui en conséquence les rend indépendantes des conditions préalables de culture et disposer d'un potentiel enzymatique important, qui règle la vitesse et la limite de la dégradation de l'acide malique.

Dans un travail antérieur portant sur ces problèmes (PEYNAUD et LAFON-LAFOURCADE, 1969 ; LAFON-LAFOURCADE, 1970), nous avons montré que le caractère constitutif du complexe enzymatique « malique » est de beaucoup le plus répandu pour les bactéries du vin ((77 p. 100 des souches étudiées). Le caractère inductible a été rencontré dans ce travail pour des souches de coques homo- et hétérolactiques ou encore de bacilles homolactiques, mais pas pour des souches de bacilles hétérolactiques. Cependant BARRE (1969) a observé des souches hétérofermentaires à activité inductible.

Parmi la centaine de bactéries étudiées, nous en avons relevé 25 particulièrement actives vis-à-vis de l'acide L-malique, capables de dégrader 50 méq. par litre dans un délai de 24 heures, avec une concentration de 1 g de cellules fraîches par litre. Il s'agit de 5 bacilles homofermentaires, 5 bacilles hétérofermentaires, 1 *Pediococcus* et 14 coques hétérofermentaires. C'est parmi ces derniers que nous avons sélectionné la bactérie de référence utilisée au cours de cette étude : *Leuconostoc gracile* Cf 34.

Recherche des conditions optimales de production du complexe enzymatique « malique »

Nous avons recherché les conditions de culture qui modifient la richesse en complexe enzymatique « malique » d'une souche déterminée, et qui permettent d'obtenir l'activité maximale. Nous avons étudié notamment les facteurs suivants : composition et pH du milieu, âge des cellules et durée de culture.

A cette fin nous avons comparé l'activité enzymatique de *Leuconostoc gracile* Cf 34, précultivé dans les milieux suivants à pH 4,5 :

1° Moût de raisin dilué deux fois, enrichi en extrait de levure ;

2° Milieu de Carr à 40 g de fructose par litre ;

3° Milieu de Carr à 40 g de glucose par litre ;

4° Milieu de Carr à 40 g de saccharose par litre ;

5° Milieu de Carr à 40 g de glucose par litre et 10 ml de jus de tomate par litre.

Les milieux de Carr ont été préparés avec ou sans addition de 5 g d'acide DL-malique par litre. Les cellules recueillies après huit jours de préculture à 25°C sont testées dans le milieu synthétique phosphaté à pH 4,0 contenant 50 méq. d'acide L-malique par litre. Voici les pourcentages d'acide malique transformé pour un

ensemencement correspondant à 60 mg de bactéries par litre après 8 jours d'incubation à 25°C :

	Avec acide malique	Sans acide malique
1	76	—
2	48	66
3	87	66
4	30	76
5	100	68

Le moût de raisin dilué additionné d'extrait de levure constitue donc, avec le milieu de Carr préparé au glucose, en particulier lorsqu'on l'enrichit en jus de tomate et en acide malique, les meilleurs milieux de culture. Ce sont ces milieux qui ont été utilisés dans la suite de l'expérimentation.

La même bactérie a été cultivée à différents pH : 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0. L'activité des cellules est exactement la même lorsque les bactéries proviennent de milieux de pH supérieur à 3,0. Par contre, les cellules issues d'une culture à pH 3,0 présentent une activité enzymatique très réduite ; elle n'est plus que le quart de celle déterminée aux pH plus élevés. Cette observation permet de saisir une des raisons pour lesquelles la fermentation malolactique s'effectue si peu aisément dans les vins ayant un pH bas. Aux difficultés de croissance bactérienne à ces pH s'ajoute en effet la faible activité enzymatique des bactéries.

L'âge de la culture a peu d'influence tant qu'il s'agit de cellules vivantes. Ainsi des cellules prélevées après 3, 5, 8, 10 jours de culture à 25°C, dans des conditions où la population maximale n'est atteinte qu'après le cinquième jour, ont montré exactement la même activité enzymatique. Pour des cultures plus âgées, on observe une perte en rapport vraisemblablement avec la diminution du nombre de cellules vivantes. L'observation est la même à 30°C, mais avec des délais de culture plus courts.

Étude des facteurs qui conditionnent la dégradation de l'acide malique

Ces facteurs sont nombreux ; ils ne sont certainement pas tous connus. On constate que la dégradation de l'acide malique se fait plus difficilement dans un vin, à conditions égales de pH, de température, de poids de bactéries, que dans le milieu synthétique d'expérimentation. Nous avons étudié les facteurs habituels, ceux qui contrôlent généralement la croissance des bactéries : température, degré alcoolique, pH, teneur en anhydride sulfureux libre et combiné à l'acétaldéhyde. Nous avons étudié encore le rôle de certains polyphénols du vin, des acides organiques.

Température.

Elle est importante à considérer dans la dégradation de l'acide malique comme dans la multiplication cellulaire. On a comparé les températures de 22°, 25°, 30° et 35°C. L'activité enzymatique, ou plus exactement la vitesse de la transformation de l'acide malique par *Leuconostoc gracile* Cf 34, est accélérée à température plus

élevée. Dans le même délai, 77 p. 100 de l'acide malique présent sont fermentés à 22 ou 25°C, 93 p. 100 à 30°C, 95 p. 100 à 35°C. La température optimale se situe autour de 35°C, c'est-à-dire à une température supérieure à celle de la croissance maximale des cellules. DOMERCQ a fixé en effet à 25°C la température optimale de la multiplication des coques ; avec ces bactéries, l'acidification lactique d'un milieu sucré est plus rapide au début à 30°C qu'à 25°C mais le taux final d'acide lactique est, par contre, moins élevé à 30°C. Le niveau des températures optimales n'est donc pas tout à fait le même lorsqu'on considère la réaction enzymatique et la croissance bactérienne.

Degré alcoolique.

Nous avons étudié la réaction enzymatique en présence de teneurs en alcool progressives de 5 à 13 p. 100 en volume avec quatorze bactéries différentes choisies pour leur richesse en complexe enzymatique « malique » de type constitutif.

1 *Lactobacillus plantarum* (souche de collection)

2 bacilles homofermentaires { 1 *Streptobacterium* : 12 ; 1 *Lactobacillus casei* : R 6

3 bacilles hétérofermentaires { 2 *Lactobacillus hilgardii* : Mz 1, E 63 ; 1 *Lactobacillus brevis* : C 12

2 coques homofermentaires : 2 *Pediococcus* : Ja 2, G 89

6 coques hétérofermentaires { 3 *Leuconostoc oinos* : Bh 12, J 2, Cz 1 ; 3 *Leuconostoc gracile* : Pa 11, Ps 1, Cf 34

D'une manière générale avec des bactéries très actives isolées de vins, la dégradation de l'acide malique est aussi rapide et totale en milieu non alcoolisé ou en milieu titrant 13°. L'inhibition n'intervient qu'à un degré alcoolique supérieur. C'est le cas pour neuf des souches étudiées. Pour quatre autres souches, la réaction enzymatique est plus ou moins fortement freinée au-delà de 11°. L'inhibition est d'autant plus marquée que le poids de cellules engagé est plus faible pour un degré alcoolique donné. Il est toujours possible de l'atténuer en augmentant le poids de bactéries mis en œuvre (tabl. 1).

TABLEAU I

Action de l'alcool éthylique sur l'activité enzymatique « malique » de Leuconostoc gracile *Cf 34 isolé de vin*

Acide malique fermenté en méq. par litre

Poids de bactéries (g/l)	Sans alcool		11°		12°			13°		
	5 h	24 h	5 h	24 h	5 h	24 h	48 h	5 h	24 h	48 h
1	19	50	19	50	16	28	30	3	8	8
2	23	50	23	50	26	48	48	3	8	8
5	33	50	40	50	46	50	50	33	33	50

Les bactéries isolées d'autres milieux que le vin, et dont la multiplication cellulaire est déjà très rapidement bloquée en présence d'alcool, possèdent de même une activité enzymatique peu résistante, inhibée presque entièrement par 5 p. 100 d'alcool. Le tableau 2 en donne un exemple pour une souche de référence de *Lactobacillus plantarum* non isolée de vin.

pH — Nous avons étudié la sensibilité au pH de la réaction enzymatique pour douze souches de bactéries :

3 bacilles homofermentaires { 2 *Lactobacillus casei :* R 6, JF 1 ; 1 *Streptobacterium :* E 1
3 bacilles hétérofermentaires { 2 *Lactobacillus hilgardii :* LL 2, F 69 ; 1 *Lactobacillus brevis :* C 12
3 coques homofermentaires : 3 *Pediococcus cerevisiae :* SV 1, Ja 2, S 51
3 coques hétérofermentaires { 2 *Leuconostoc oinos :* R 7, IT 4 ; 1 *Leuconostoc gracile :* Cf 34

TABLEAU 2

Action de l'alcool éthylique sur l'activité enzymatique « malique » de Lactobacillus plantarum *non isolé de vin*

Acide malique fermenté en méq. par litre.

Poids de bactéries (g/litre)	Sans alcool			5°			10°	11°
	5 h	24 h	48 h	5 h	24 h	48 h	48 h	48 h
1	4	23	38	0	3	4	0	0
2	10	44	50	1	3	6	0	0
5	16	50	50	6	26	34	8	3

La gamme des pH étudiés est la suivante : 3,0, 3,5, 4,0, 4,5. La figure 1 illustre quelques résultats obtenus.

Pour les bacilles, le pH optimum de la réaction enzymatique se situe entre 3,5 et 4,0. On observe une nette inhibition à pH 3,0 ; généralement la réaction n'est que ralentie, mais l'inhibition peut être complète avec certaines bactéries. A l'autre bout de l'échelle une élévation du pH jusqu'à 4,5 provoque généralement une diminution d'activité. Elle est variable et peut atteindre 60 p. 100 pour un *Lactobacillus brevis*. Par contre, pour certains *Lactobacillus hilgardii*, le complexe enzymatique est moins sensible au pH et est aussi actif à pH 4,5 qu'à pH 3,0.

Pour les coques, la réaction enzymatique s'effectue en moyenne à un pH plus bas et de façon identique de pH 3,0 à pH 4,0. Cependant le phénomène se trouve fortement freiné à pH 4,5.

En fait, on peut fixer à 3,5 ou 4,0 le pH optimum de la réaction de dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes. Mais cette réaction

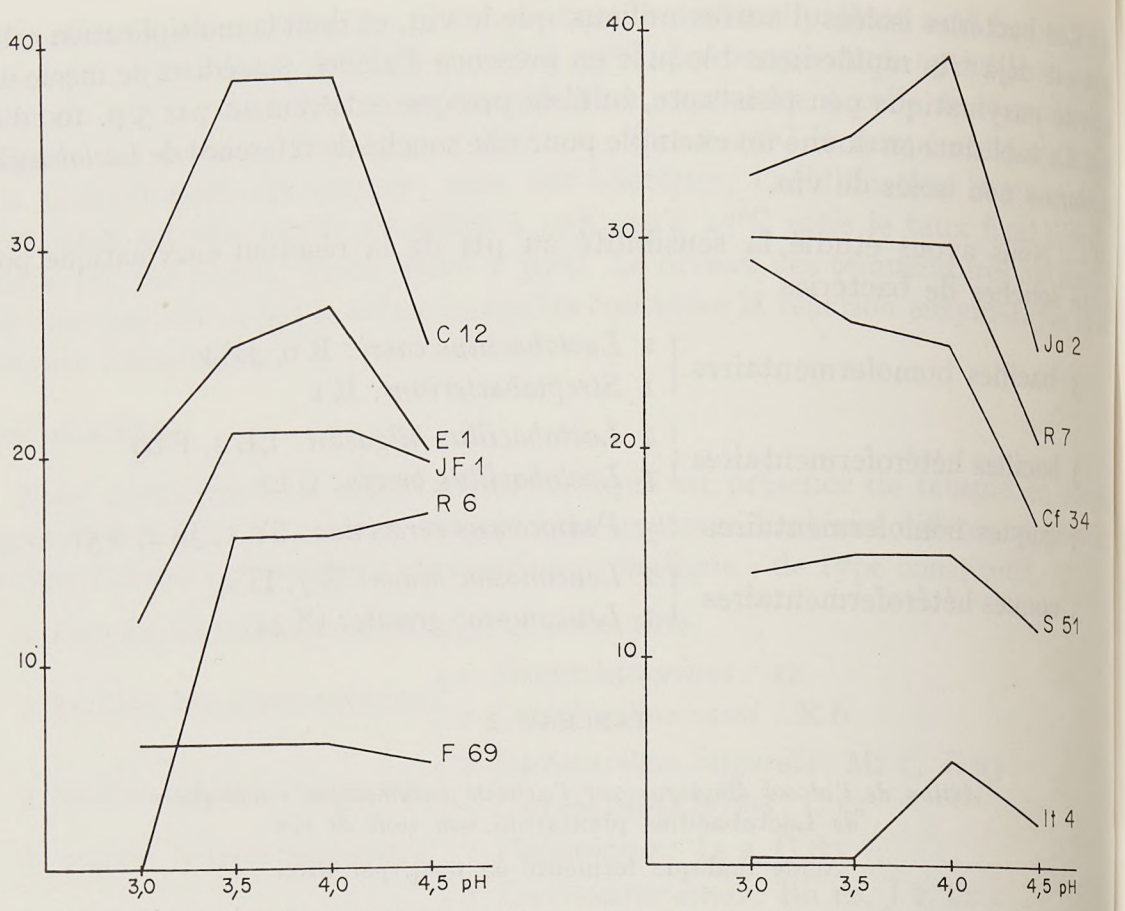


FIG. 1. — *Dégradation de l'acide malique en fonction du pH avec diverses bactéries*

A gauche : C 12 *Lactobacillus brevis ;* E 1 *Lactobacillus casei ;* JF 1 *Lactobacillus casei ;* R 6 *Lactobacillus casei ;* F 69 *Lactobacillus hilgardii.*

A droite : Ja 2 *Pediococcus cerevisiae ;* R 7 *Leuconostoc oinos ;* Cf 34 *Leuconostoc gracile ;* S 51 *Pediococcus cerevisiae ;* It 4 *Leuconostoc oinos.*

se déroule à la même vitesse encore à pH 3,0 dans le cas des coques et de *Leuconostoc gracile* Cf 34. Par ailleurs, il est possible, dans une certaine mesure, de diminuer l'influence du pH en augmentant le poids de cellules mis en œuvre.

Action de l'anhydride sulfureux libre et combiné.

L'anhydride sulfureux est un puissant inhibiteur du complexe enzymatique « malique ». Si l'on ajoute des doses de 5 à 10 mg de SO_2 au milieu d'expérimentation, la dégradation de l'acide malique n'est possible qu'avec des poids plus élevés de bactéries, par exemple 1 g par litre au lieu de 60 mg. Elle n'est d'ailleurs jamais complète avec 10 mg de SO_2 et 1 g de bactéries. Au-dessus de ces doses, il n'y a plus de dégradation possible. On conçoit donc que quelques mg d'anhydride sulfureux libre dans un vin constituent un obstacle insurmontable pour la fermentation malolactique.

L'anhydride sulfureux combiné à l'acétaldéhyde a également une action inhibitrice, plus faible, mais extrêmement gênante dans la pratique. Cette action a été observée par FORNACHON (1963). Nous avons étudié pour *Leuconostoc gracile* et *Lactobacillus plantarum* l'influence sur la réaction enzymatique de doses croissantes d'anhydride sulfureux combiné à l'acétaldéhyde, jusqu'à 50 mg par litre. Le tableau donne les résultats obtenus avec *Leuconostoc gracile* Cf 34.

Le seuil de sensibilité varie suivant le poids de bactéries utilisé. 50 mg d'anhydride sulfureux combiné diminuent à peine la dégradation de l'acide malique avec 5 g de bactéries par litre, mais elle est diminuée de 25 p. 100 avec 2 g et de 50 p. 100 avec 1 g de bactéries. Quand l'ensemencement est faible, des doses minimes de SO_2 combinées sont inhibitrices.

TABLEAU 3

Inhibition par le SO_2 combiné à l'acétaldéhyde de la dégradation de l'acide malique par Leuconostoc gracile *Cf 34*

Acide malique fermenté en méq par litre. Teneur de départ : 60 méq.

Poids de bactéries (g/litre)	Témoin		+ 10 mg		+ 20 mg		+ 50 mg	
	5 h	24 h	5 h	24 h	5 h	24 h	5 h	24 h
1	20	47	20	37	18	32	18	25
2	25	57	25	55	23	45	15	36
5	35	60	35	58	31	54	25	45

L'inhibition est peu accusée dans les premières heures ; elle s'accentue progressivement et paraît beaucoup plus forte dans les mesures faites après 48 heures qu'au début. Elle croît en fonction de la concentration en anhydride sulfureux combiné et diminue quand le poids de cellules augmente. Bien qu'il soit possible, dans une certaine mesure, de s'opposer à l'action inhibitrice de l'anhydride sulfureux en augmentant la concentration enzymatique, il est certain que le sulfitage est l'obstacle le plus courant rencontré dans la pratique des ensemencements bactériens.

On peut prévoir que les autres combinaisons qu'engage l'anhydride sulfureux dans les vins, et qui sont plus dissociables que l'acide aldéhyde-sulfureux, ont des propriétés inhibitrices plus marquées.

Action de certains constituants du vin.

Pour expliquer les réponses différentes d'activité du complexe enzymatique « malique » en milieu synthétique et dans le vin, nous avons étudié la dégradation de l'acide malique en présence des matières minérales, des acides organiques et de certains polyphénols que l'on trouve dans le vin.

Les enrichissements en matières minérales essayées, notamment en magnésium et en manganèse, n'ont pas eu d'action positive. Cependant leur rôle de catalyseurs de cette réaction est bien connu. Il est probable que le matériau enzymatique brut que nous utilisons, constitué par la masse bactérienne mise en œuvre, apporte les cations et les oligo-éléments nécessaires à la réaction.

Nous avons déterminé l'influence, à pH égal, des acides suivants : tartrique, citrique, lactique, succinique, acétique. Le tableau 4 donne des termes de comparaison. Tous les anions organiques exercent une légère inhibition. La plus marquée est produite par 3 g d'acide lactique. La dégradation de l'acide malique étant une réaction d'équilibre, il est normal que l'accumulation d'un des produits de la réaction, l'acide lactique, en limite la vitesse et le terme. Proportionnellement, c'est peut-être,

d'ailleurs, l'acide succinique qui gêne le plus la réaction, mais il est vraisemblable que les 80 à 100 méq. d'anions organiques que contiennent les vins contribuent à rendre ce milieu peu favorable à la transformation malolactique.

Nos observations ont porté également sur l'action de quelques polyphénols parmi ceux rencontrés dans les vins : malvidol (200 mg par litre), leucoanthocyanes (2 g),

TABLEAU 4

Action des anions organiques sur la dégradation de l'acide malique par Leuconostoc gracile *Cf 34*

Acide malique fermenté en 24 heures en méq. par litre. Teneur de départ : 70 méq.

Poids de bactéries (g/litre)	Témoin	Tartrique 3 g	Citrique 1 g	Lactique 3 g	Succinique 2 g	Acétique 2 g
1	36	27	30	17	19	32
2	51	39	45	23	30	41
5	68	45	68	41	48	60

quercétol (50 mg), acide caféique (50 mg), acide *p*-coumarique (50 mg), acide chlorogénique (qui n'a d'ailleurs pas été trouvé dans les vins) (50 mg), acide gallique (1 g).

A part l'acide gallique qui, à 1 g par litre, provoque une inhibition notable, au moins pour les poids les plus faibles de bactéries, les autres substances essayées n'ont pas modifié l'activité enzymatique dans les conditions expérimentales.

Poids de bactéries utilisé dans la réaction de dégradation

Au cours de ce travail, nous avons observé qu'il était possible de remédier dans une certaine mesure à l'action défavorable de certains facteurs en augmentant la quantité du complexe enzymatique malique impliqué dans la réaction. Ainsi le poids de cellules bactériennes mis en œuvre contrôle directement la vitesse et la limite de la dégradation malolactique.

Par exemple, dans des conditions optimales de pH, dans un milieu dépourvu de facteurs inhibiteurs, la transformation de 60 méq. d'acide L-malique par litre est obtenue en 24 heures à 30°C avec 5 g de cellules fraîches de bactéries par litre ; 48 heures sont nécessaires pour obtenir un résultat identique avec 2 g de cellules et 20 jours avec 100 mg. La réaction n'est pas terminée après ce délai avec 50 mg de cellules par litre.

Nous avons vu, d'autre part, que la masse bactérienne apporte avec le complexe enzymatique « malique » les cations qui catalysent la réaction enzymatique ; elle apporte probablement aussi les coenzymes qui participent au phénomène.

Nous avons suivi la disparition de 60 méq. d'acide L-malique dans le milieu phosphaté à pH 4,0 à 25°C, et également en présence de 10 mg de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) ou de 5 p. 100 en volume d'un autolysat de levures, avec un poids relativement faible de cellules de *Leuconostoc gracile*, 20 mg par litre. Dans ces conditions, la dégradation malolactique s'effectue lentement. Après 4 semaines d'incuba-

tion, 50 p. 100 seulement de l'acide L-malique initial sont transformés dans le milieu témoin. En présence de 10 mg de NAD par litre, la vitesse du processus est nettement accrue ; en présence d'autolysat de levures, la réaction est complète en deux semaines.

Le phénomène est encore plus marqué lorsqu'on utilise des cellules conservées préalablement pendant 15 jours à 4°C. La perte d'activité des cellules dépasse 30 p. 100. Cependant en présence de NAD ou d'autolysat de levures la vitesse de la réaction est rétablie et elle est identique à celle obtenue avec des cellules fraîches. (fig. 2).

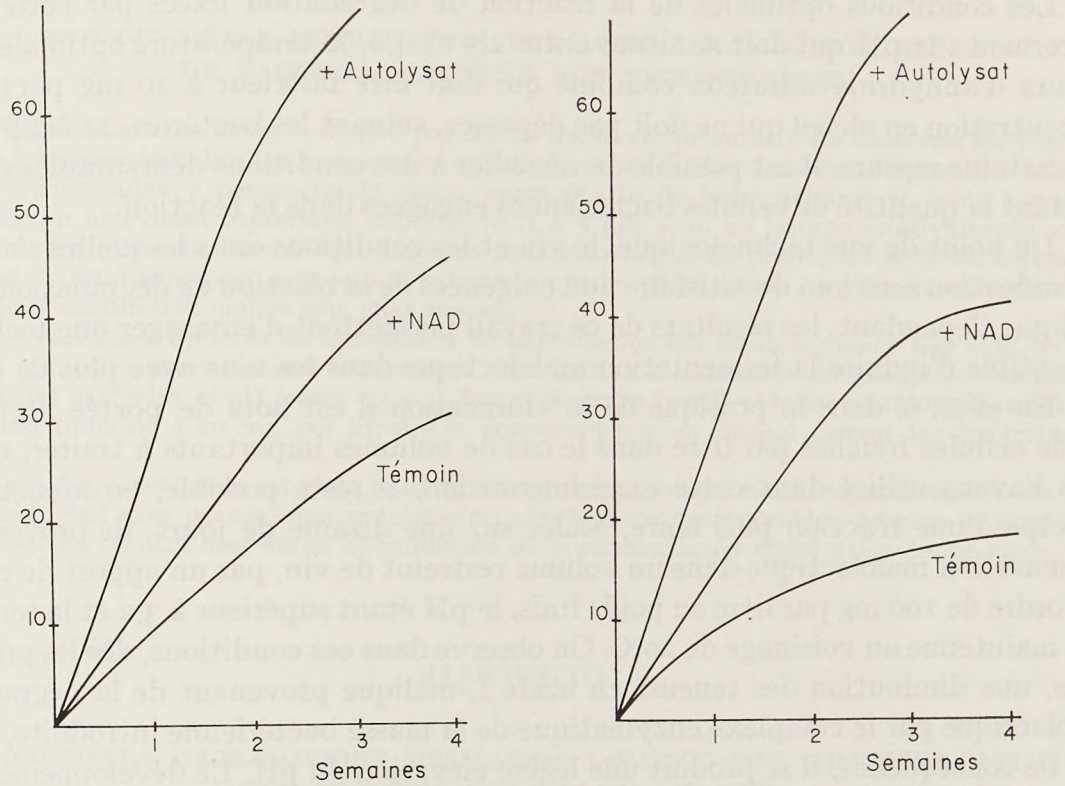


FIG. 2. — *Activation de la dégradation de l'acide malique par addition de NAD ou d'autolysat de levures. 20 mg de bactéries par litre, température 25°C, durée 4 semaines*

A gauche : Utilisation de cellules bactériennes fraîches.
A droite : Utilisation de cellules conservées 8 jours à 4°C.

La même expérience réalisée cette fois avec des poids plus importants, 1, 2, 5 g de cellules de la même bactérie, montre que la dégradation malolactique n'est plus affectée par l'addition de NAD ou d'autolysat de levures.

La préparation enzymatique brute constituée par la masse bactérienne contient donc, outre le complexe enzymatique malique, le coenzyme NAD nécessaire et certainement d'autres substances qui sont capables d'activer la réaction et qui se trouvent dans l'autolysat de levures. Lorsque le poids de cellules engagé est assez important, l'apport de ces substances indispensables couvre largement les besoins de la réaction.

CONCLUSIONS. APPLICATIONS TECHNOLOGIQUES

La dégradation de l'acide L-malique en acide L (+) lactique par les cellules non proliférantes de bactéries lactiques est une réaction dont la vitesse et le terme

dépendent du rapport entre le poids des réactifs en présence et des conditions dans lesquelles s'effectue le processus.

Le taux d'acide L-malique à transformer étant dans un vin une donnée intangible, il est seulement possible d'agir sur le potentiel enzymatique entrant dans la réaction, soit en augmentant le poids des cellules mis en œuvre, soit en utilisant des souches sélectionnées pour leur plus grande activité. Cela implique, en outre, un choix selon des critères que nous avons définis, de nature constitutive ou inductible de l'activité enzymatique et de mode de culture des bactéries.

Les conditions optimales de la réaction de dégradation fixées par cette étude concernent : le pH qui doit se situer entre 2,5 et 4,0, la température optimale, 30°C, le taux d'anhydride sulfureux combiné qui doit être inférieur à 20 mg par litre, la concentration en alcool qui ne doit pas dépasser, suivant les bactéries, 11 à 14°. Dans une certaine mesure, il est possible de remédier à des conditions défavorables en augmentant la quantité de cellules bactériennes engagées dans la réaction.

Du point de vue technologique, le vin et les conditions dans lesquelles s'effectue la vinification sont loin de satisfaire aux exigences de la réaction de dégradation malolactique. Cependant, les résultats de ce travail permettent d'envisager une technique susceptible d'induire la fermentation malolactique dans les vins avec plus de sûreté.

En effet, si dans la pratique de la vinification il est hors de portée de fournir 5 g de cellules fraîches par litre dans le cas de volumes importants à traiter, comme nous l'avons utilisé dans cette expérimentation, il reste possible, en admettant le principe d'une réaction plus lente, étalée sur une dizaine de jours, de provoquer la fermentation malolactique dans un volume restreint de vin, par un apport de cellules de l'ordre de 100 mg par litre en poids frais, le pH étant supérieur à 3,2 et la température maintenue au voisinage de 20°C. On observe dans ces conditions, dès les premiers jours, une diminution des teneurs en acide L-malique provenant de la dégradation malolactique par le complexe enzymatique de la masse bactérienne introduite, et par voie de conséquence, il se produit une légère élévation du pH. Le développement des bactéries, ainsi favorisé, intervient alors et le phénomène se poursuit en s'autoalimentant en enzyme. Le volume de vin soumis à ce traitement constitue un excellent « pied de cuve », riche en activité malique et bactéries vivantes bien adaptées au milieu et dont il suffit d'augmenter le volume pour déclencher une fermentation malolactique dans l'ensemble d'une cave.

Reçu pour publication en juin 1970.

SUMMARY

RESEARCH ON L-MALIC ACID DEGRADATION BY NON-PROLIFERATING LACTIC BACTERIA ISOLATED FROM WINES

L-malic acid degradation by a certain number of lactic bacteria isolated from wines, lactobacilli and cocci, was studied in a synthetic medium devoid of nitrogenous substances and consisting of no other hydrocarbonate source except L-malic acid, more often with a considerable bacterial mass (1 to 5 g per l) and in a relatively short period of time (5 to 48 h). These conditions, prohibiting practically all cell proliferation, their activity opposite the substratum can be attributed, on first approximation, to the malic enzymatic potential which they possess.

The optimum conditions of the L-malic acid degradation reaction were determined for what concerns different factors : the constituent or inductible quality of the « malic » enzymatic complex

of the bacteria, pH (between 3,5 and 4), temperature (30°C), combined sulphuric anhydride rate (less than 20 mg per l), alcohol concentration (according to the bacteria from 11 to 14°).

This research, bearing on a great number of stocks, throws certain of them into relief for their greater activity or their tolerance of unfavourable factor. It also makes possible the anticipation of a more efficient technique of inducing malolactic fermentation in wines.

RESUMEN

ESTUDIO DE LA DEGRADACION DEL ACIDO L-MALICO POR MEDIO DE BACTERIAS LACTICAS NON PROLIFERANTES

La degradación del acido L-malico por medio de un cierto numero de bacterias lacticas aisladas de los vinos, lactobacilos y coccos, es estudiada en un medio sintético, desprovisto de substancias nitrogenadas y comportanda como unica fuente de hidrocarburos el acido L-malico, amenudo con una masa bacteriana importante (1 à 5 g/l) y en un tiempo relativamente corto (5 à 48 h). En estas condiciones que impiden practicamente toda proliferacion de las células, la actividad de las mismas con respecto al substrato puede ser atribuida en primera aproximacion al potencial enzimatico malico que ellas poseen.

Las condiciones óptimas de la reaccion de degradacion del acido L-malico han sido der terminadas para diferentes factores : la calidad constitutiva o inductible del complejo enzimatico malico de las bacterias, el pH (entre 3,5 y 4), la temperatura (30°C), el tenor en anhidrido sulfuroso combinado (inferior a 20 mg por litro) y la concentracion en alcohol (segun las bacterias de 11 à 14°).

Este trabajo, realizado sobre un gran numero de cepas, ha permitido separar algunas de ellas por su actividad mas intensa a por su tolerancia a los factores desfavorables. Ademas ha permitido de preveaer un técnica mas eficaz de inducción de la fermentación malolactica de los vinos.

RIASSUNTO

STUDIO DELLA DEGRADAZIONE DELL'ACIDO L-MALICO CON I BATTERI LATTICI NON PROLIFERANTI ISOLATI DEI VINI

La degradazione dell'acido L-malico per un certo numero di batteri lattici isolati dei vini, lattobacilli e cocci, è studiata in mezzo sintetico sprovvisto di sostanze azotate e aventi come fonti idrocarbonate solo l'acido L-malico, il più spesso con un'importante massa batterica (da 1 a 5 g. per l) e in un tempo relativamente corto (da 5 a 48 ore).

Poichè queste condizioni non permettono praticamente alcuna proliferazione delle cellule, la loro attivitá nei confronti del sottostrato puo' essere imputata, in prima approssimazione, al potenziale enzimatico malico che esse possiedono.

Le condizioni ottimali della reazione di degradazione dell'acido L-malico sono state determinate per quanto riguarda diversi fattori : la qualità di costituzione o d'induzione del complesso enzimatico « malico » dei batteri, il pH (tra 3, 4 e 5) l'anidride solforosa combinata (inferiore a 20 mg per l), la concentrazione in alcool (secondi i batteri da 11 a 14°)

Questi studi sono stati fatti con un gran numero di ceppi. Alcuni di questi ultimi risaltano per la loro grande attività o la loro tolleranza nei confronti dei fattori sfavorevoli. Tali studi permettono inoltre di prevedere una tecnica più efficace d'induzione della fermentazione malolattica nei vini.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARRE P., 1969. Taxonomie numérique de lactobacilles isolés du vin. *Arch. Mikrobiol.*, **68**, 74-86.

FORNACHON J.-C.-M., 1963. Travaux récents sur la fermentation malolactique. Symposium international d'Œnologie, Bordeaux. *Ann. Technol. agric.*, **12**, n° hors série, 45.

JERCHEL D., FLESCH P., BAUER E., 1956. Untersuchungen zum Abbau der L-Äpfelsäure durch *Bacterium gracile*. *Ann. Chem.*, **601**, 40.

Lafon-Lafourcade S., Domercq S., Peynaud E., 1968. Étude de l'ensemencement des vins par les bactéries de la fermentation malolactique. *Conn. Vigne Vin*, **2**, 83.

Lafon-Lafourcade S., 1970. Propriétés de l' « enzyme malique » des bactéries lactiques isolées de vins. *Conn. Vigne Vin*, à paraître.

Peynaud E., Lafon-Lafourcade S., 1970. Nature de l'enzyme malique des bactéries lactiques isolées de vins. *C. R. Acad. Sci.*, **270**, série D, 228.

Radler F., 1957. Untersuchungen über die experimentelle Durchführung des biologischen Säureabbaues. *Vitis*, **1**, 42.

Ann Technol. agric., 1970, **19** (2), 155-175.

ÉTUDE DU BILAN THERMIQUE D'UN VINIFICATEUR CONTINU

D. BARRILLON, A. GAC, G. PIERSON et C. POUX*

Section du Froid et des Industries agricoles, C. E. R. A. F. E. R., Parc de Tourvoie, 92 - Antony

**Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne*
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Le contrôle des températures dans un vinificateur continu joue un rôle très important dans la surveillance d'une fermentation.

Cette étude a été faite sur un vinificateur métallique, type Vico, de 4 000 hectolitres, à simple tour, muni d'un système de refroidissement. Les températures dans la cuve et dans l'air sont mesurées à l'aide de sondes thermoélectriques cuivre-constantan et d'un potentiomètre enregistreur électronique. Les débits d'eau, les consommations d'énergie électrique, sont mesurés par compteurs.

On note ainsi une évolution périodique, avec de faibles fluctuations, de la température moyenne du vinificateur. La température de l'air ambiant ne semble pas avoir d'influence immédiate. Par contre, la température d'introduction de la vendange a une influence certaine sur la température moyenne du vinificateur. A l'intérieur de celui-ci, les températures les plus élevées se trouvent dans le chapeau de marc, dans la partie médiane non immergée.

Le bilan de la fermentation, exprimant les quantités de sucres fermentés, tient compte de la masse de sucre introduite avec la vendange et de la masse de sucre retiré.

Le bilan énergétique global tient compte du bilan énergétique de la fermentation, de celui de la vinification, des pertes de vinification et des échanges par les parois.

L'étude du bilan énergétique montre qu'un vinificateur doit éliminer approximativement 40 p. 100 de la chaleur de fermentation.

I. — INTRODUCTION. OBJET DE L'ÉTUDE

Le contrôle des températures dans un vinificateur continu a un rôle très important car la maîtrise des températures constitue un des éléments essentiels d'une bonne fermentation.

Il convenait :

— d'enregistrer les diverses températures à l'intérieur de l'appareil pour définir leur répartition,

— d'établir un bilan thermique journalier de l'appareil au cours des vendanges en marche normale et stable.

Cette expérimentation a été faite à la Cave Coopérative de l'Avenir à La Redorte (Aude) sur un vinificateur continu de 4 000 hectolitres, type Vico, au cours de la vendange 1968.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

2. 1. *Vinificateur*

Le vinificateur type Vico de 4 000 hectolitres est un appareil à simple tour, métallique, sur lequel est prévu un système de refroidissement. Le refroidissement est obtenu par pulvérisation et ruissellement d'eau sur l'enveloppe extérieure du vinificateur. Le niveau d'entrée de vendange est situé à peu près au tiers inférieur de la tour. L'extraction du marc s'effectue à la partie supérieure de l'appareil au moyen d'une auge radiale dont le fond incliné permet d'évacuer par gravité vers l'extérieur le marc extrait par un râteau placé au-dessus de la vendange. L'évacuation de vin se fait aussi dans la partie haute de l'appareil à l'aide d'une goulotte à niveau réglable qui permet ainsi de maîtriser le niveau de liquide à l'intérieur du vinificateur.

2. 2. *Grandeurs physiques*

La mesure des températures dans le vinificateur est effectuée à l'aide de sondes thermoélectriques cuivre-constantan et d'un potentiomètre enregistreur électronique à 16 directions dont la durée du cycle est de 64 secondes. Au potentiomètre est annexé un commutateur manuel de directions qui permet l'enregistrement de 32 directions au total.

La détermination des températures dans la partie inférieure de l'appareil, au sein même de la vendange, est faite au moyen d'une sonde métallique tubulaire de 12 m. de longueur qui est enfoncée par la partie supérieure. Cette sonde peut être placée en deux positions diamétralement opposées (1 et 1′, fig. 1) et permet des relevés de température du fond du vinificateur jusqu'à la partie inférieure de la capacité à vin. Dans la capacité à vin, des sondes thermoélectriques sont fixées aux points 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (cf. fig. 1). La sonde 11 placée à l'intérieur de la goulotte de soutirage indique la température du vin extrait. La sonde 12 placée sur la canalisation d'entrée de vendange donne la température de la vendange tout au long de la journée.

Les températures de l'air ambiant sont enregistrées par cinq sondes thermoélectriques. L'une d'entre elles est placée au sommet de la cuve, les quatre autres sont réparties sur la face externe du vinificateur pour des expositions différentes.

Un compteur volumétrique placé sur la canalisation d'amenée d'eau permet de déterminer les débits. De plus, deux compteurs électriques donnent la consommation d'énergie électrique du moteur de l'extracteur et de la pompe de lessivage.

Une petite sonde tubulaire mobile permet aussi de mesurer la température du chapeau de marc, lorsque le râteau de l'extracteur de marc est à l'arrêt.

2. 3. *Fermentation des sucres*

L'évolution des sucres (Sémichon et Flanzy, 1926) et de l'alcool (Flanzy, Bouzigues et Bouzigues, 1955) a été suivie par des dosages quotidiens effectués sur des échantillons pris :

le matin avant la rentrée,
le soir après l'introduction de la vendange.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

L'estimation journalière de la vendange a été effectuée à la cave par la somme des chargements individuels dont la masse et le degré réfractométrique sont des données connues.

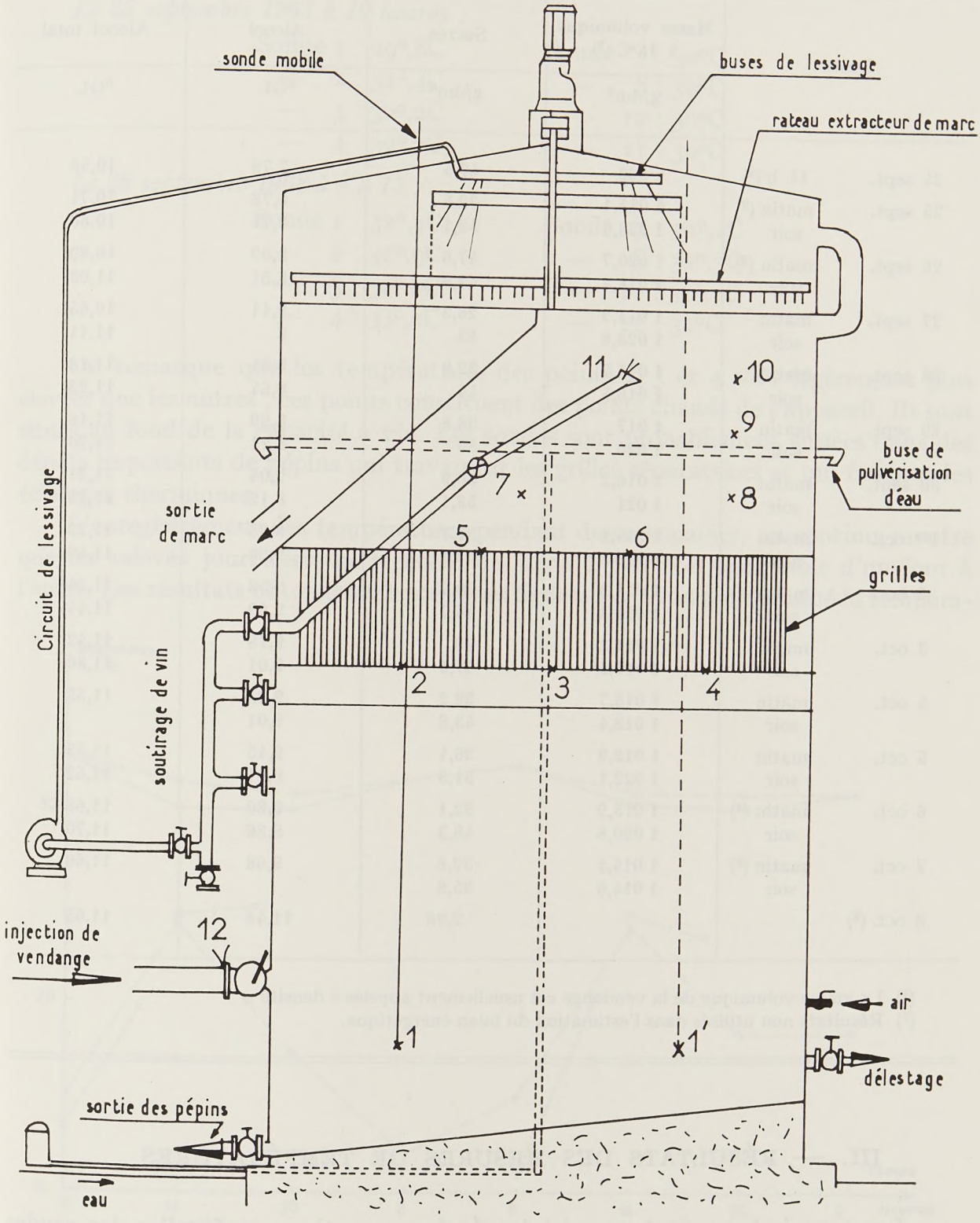


FIG. 1. — *Disposition des sondes dans le vinificateur continu de 4 000 hl*

TABLEAU I

Évolution du sucre et de l'alcool au cours des vendanges 1968

Dates		Masse volumique à 15°C (1)	Sucres	Alcool	Alcool total
		g/dm³	g/dm³	°GL	°GL
24 sept.	14 h (2)	1 022	47,5	7,79	10,58
25 sept.	matin (2)	1 015,1	32,9	8,78	10,71
	soir	1 023,4	52,1	7,74	10,80
26 sept.	matin (2)	1 020,7	47,6	8,09	10,89
	soir	1 018,3	42,9	8,51	11,03
27 sept.	matin	1 011,9	26,3	9,11	10,65
	soir	1 023,8	53	8	11,11
28 sept.	matin	1 015,7	39,9	8,84	11,18
	soir	1 016,5	44	8,64	11,22
29 sept.	matin	1 017	38,8	8,90	11,18
	soir	1 020	50	8,11	11,20
30 sept.	matin	1 016,2	36,9	9,04	11,21
	soir	1 021	53,1	8,12	11,24
1er oct.	matin	1 014,1	31,7	9,36	11,22
	soir	1 016,3	37,6	9,28	11,49
2 oct.	matin	1 013,9	30,9	9,53	11,34
	soir	1 014,3	36,7	9,29	11,44
3 oct.	matin	1 011,2	28	9,78	11,42
	soir	1 017,9	47,5	9,01	11,80
4 oct.	matin	1 015,7	39,2	9,25	11,55
	soir	1 018,4	43,8	9,01	
5 oct.	matin	1 013,9	36,4	9,45	11,59
	soir	1 022,1	51,3	8,61	11,62
6 oct.	matin (2)	1 013,9	32,1	9,80	11,68
	soir	1 020,8	48,3	8,86	11,70
7 oct.	matin (2)	1 014,1	32,8	9,68	11,60
	soir	1 014,6	35,8		
8 oct. (2)			2,98	11,48	11,65

(1) La masse volumique de la vendange est usuellement appelée « densité ».
(2) Résultats non utilisés dans l'estimation du bilan énergétique.

III. — RÉSULTATS DES MESURES DE TEMPÉRATURES

Les températures sont enregistrées de façon continue sauf celles des sondes mobiles qui sont mises en place par la partie supérieure du vinificateur quand l'extracteur de marc ne fonctionne pas. Lorsque le vinificateur est rempli en totalité et que la marche en continu est établie, on obtient une régulation de la température puisqu'on enlève du vin chaud et qu'on introduit à sa place de la vendange plus froide;

on constate alors que les températures à l'intérieur du vinificateur sont à peu près homogènes sans gradient de température important comme le montrent ces deux relevés donnés à titre d'exemple.

Le 25 septembre 1968 à 19 heures :

Sonde 1 : 29°,8C	Sonde 7 : 30°C
— 2 : 31°,4C	— 8 : 30°C
— 3 : 30°,2C	— 10 : 30°C
— 4 : 30°,7C	— 11 : 30°C

Le 26 septembre 1968 à 8 h 15 :

Sonde 1 : 32°,4C	Sonde 7 : 32°,2C
— 2 : 32°,9C	— 8 : 32°,3C
— 3 : 32°,6C	— 10 : 31°,7C
— 4 : 33°,2C	— 11 : 32°C

On remarque que les températures des points 2, 3 et 4 sont légèrement plus élevées que les autres ; ces points constituent des points chauds de l'appareil. Ils sont situés au fond de la capacité à vin. Les sondes sont probablement situées dans des dépôts importants de pépins qui traversent les grilles séparatrices et qui freinent les échanges thermiques.

L'enregistrement des températures pendant deux semaines, en continu, montre que les relevés journaliers se répètent de façon à peu près semblable d'un jour à l'autre. Les résultats obtenus sont présentés figures 2 à 7 ; on a déterminé la tempéra-

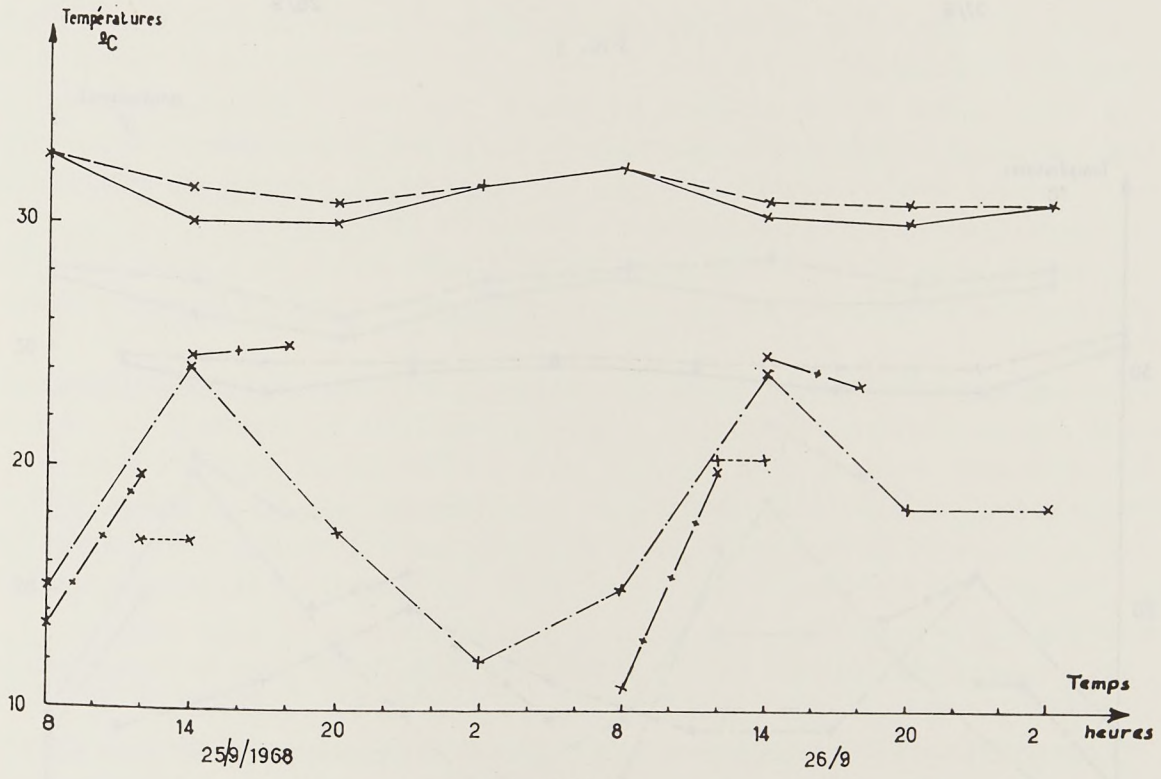


FIG. 2

——— Température moyenne du vinificateur
— . — Température moyenne de l'air
—+— Température entrée vendange
——— Points chauds de l'appareil
. . . . . Température d'eau de pulvérisation

ture moyenne du vinificateur quatre fois par jour en faisant la moyenne des 8 températures des sondes 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10 et 11. On a porté sur le même graphique la température d'entrée de vendange et la température moyenne de l'air ambiant qui est la moyenne arithmétique des cinq relevés effectués.

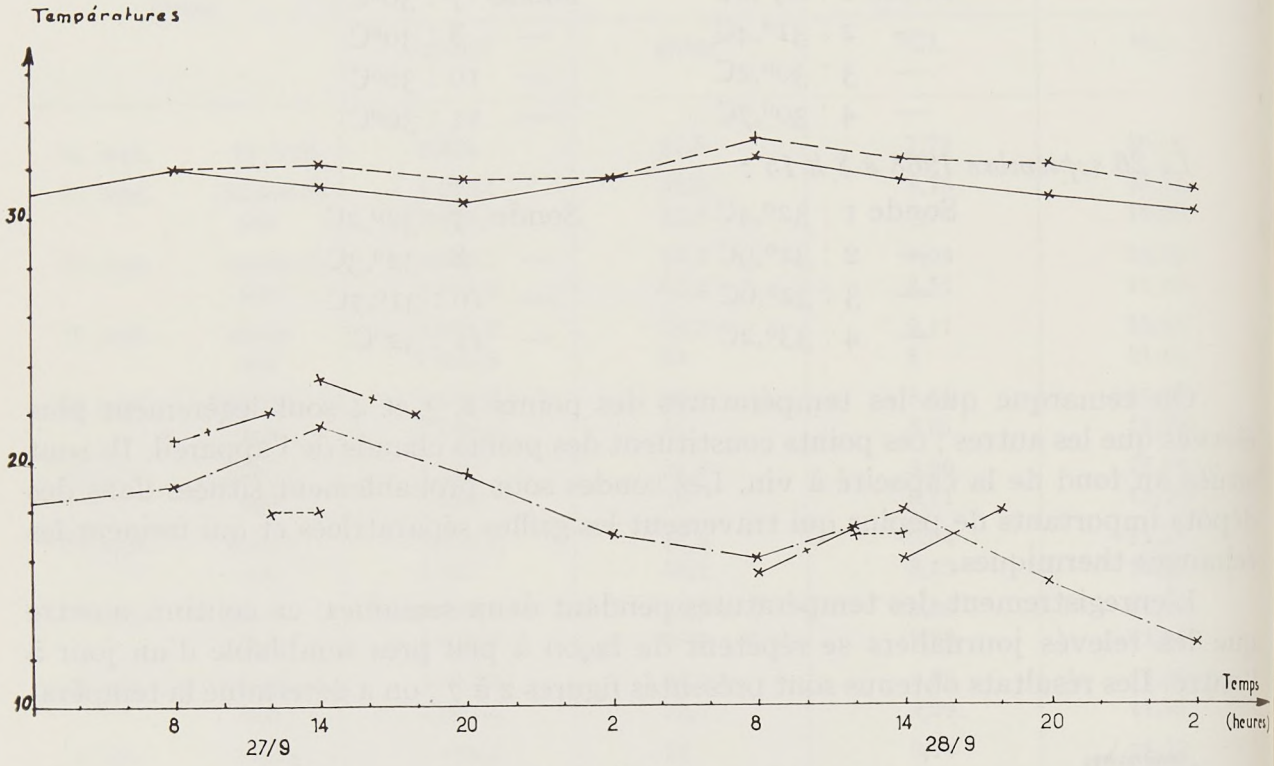


FIG. 3

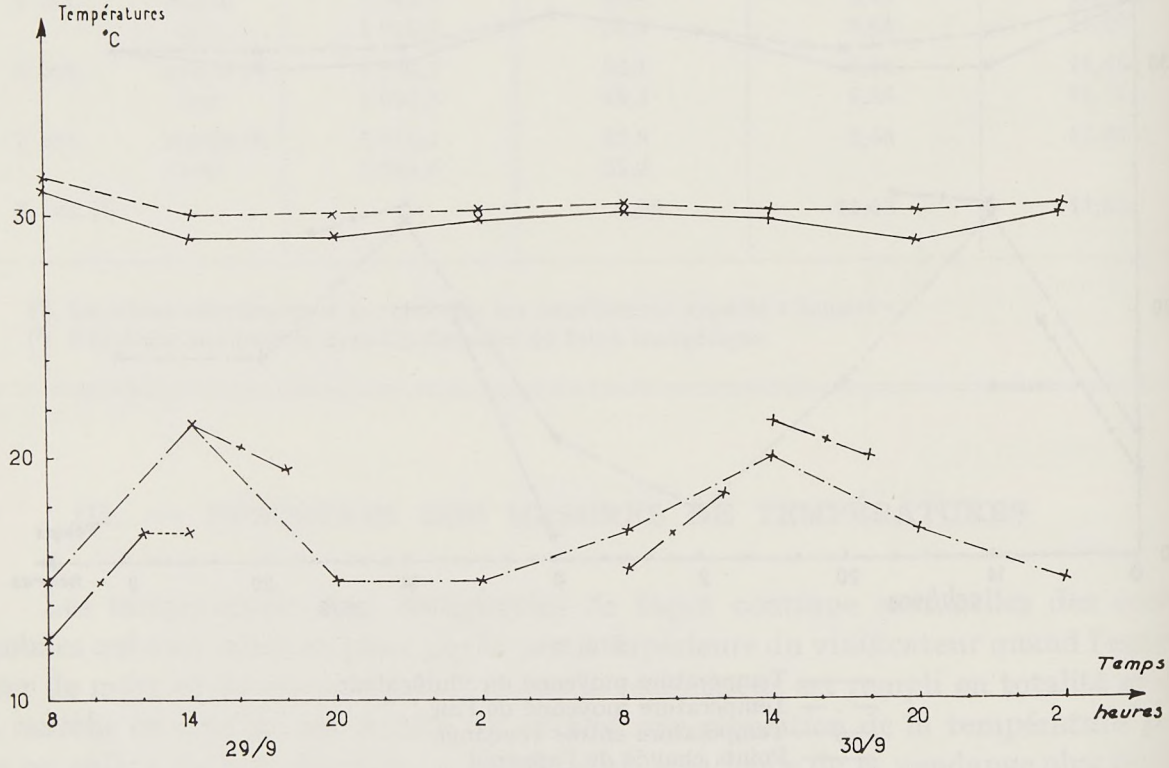


FIG. 4

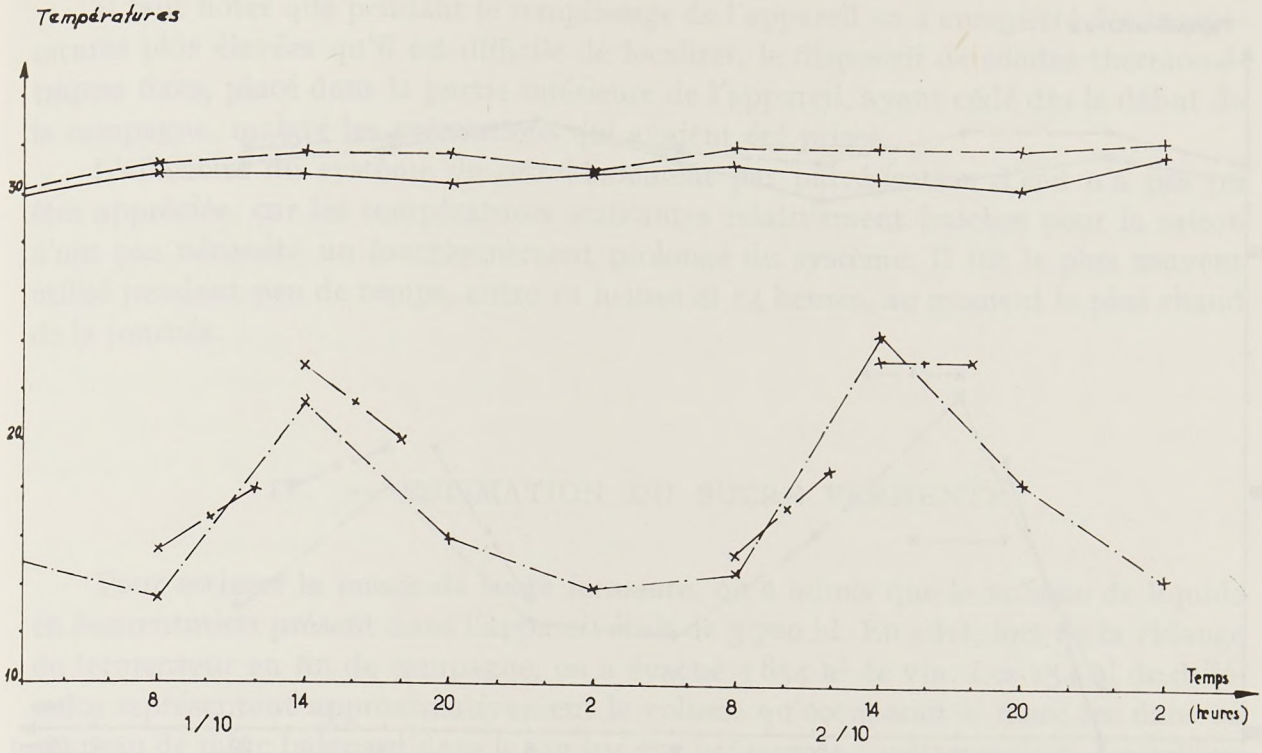

Températures
30
20
10
8
14
20
2
8
14
20
2
Temps
(heures)
1/10
2/10

FIG. 5

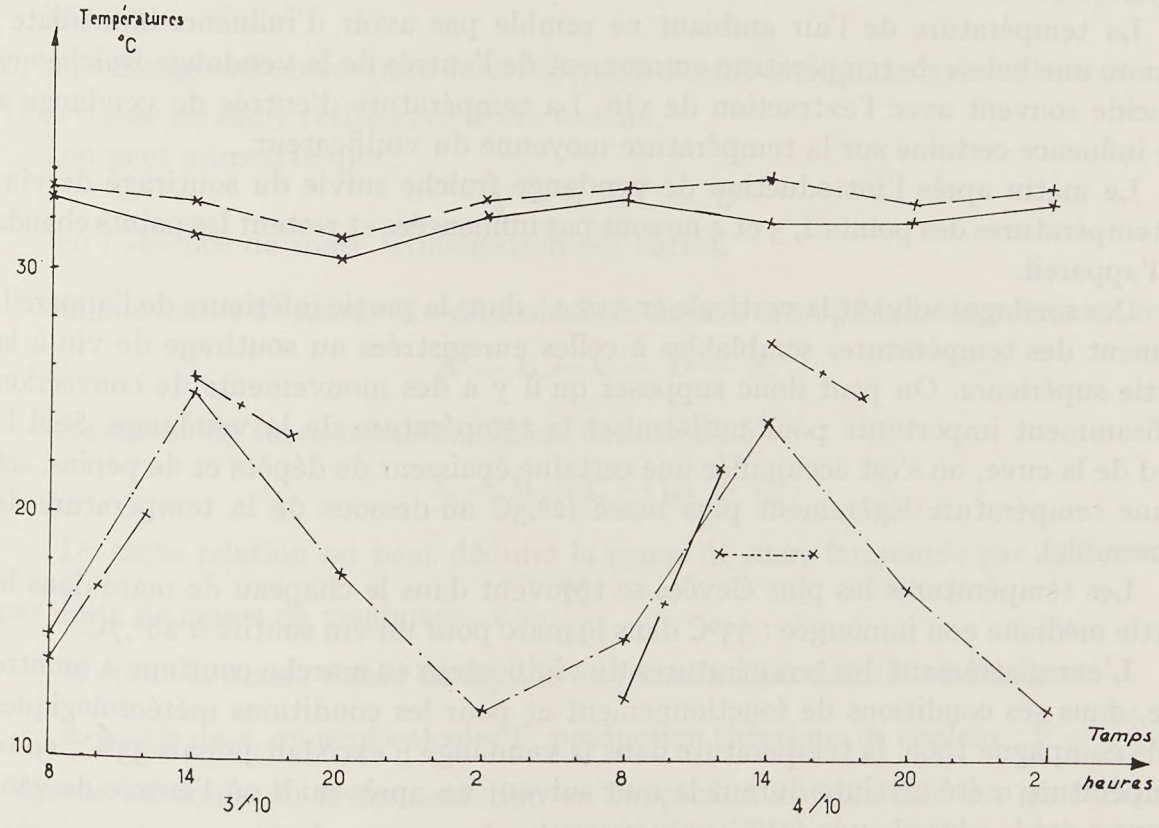

Températures
°C
30
20
10
8
14
20
2
8
14
20
2
Temps
heures
3/10
4/10

FIG. 6

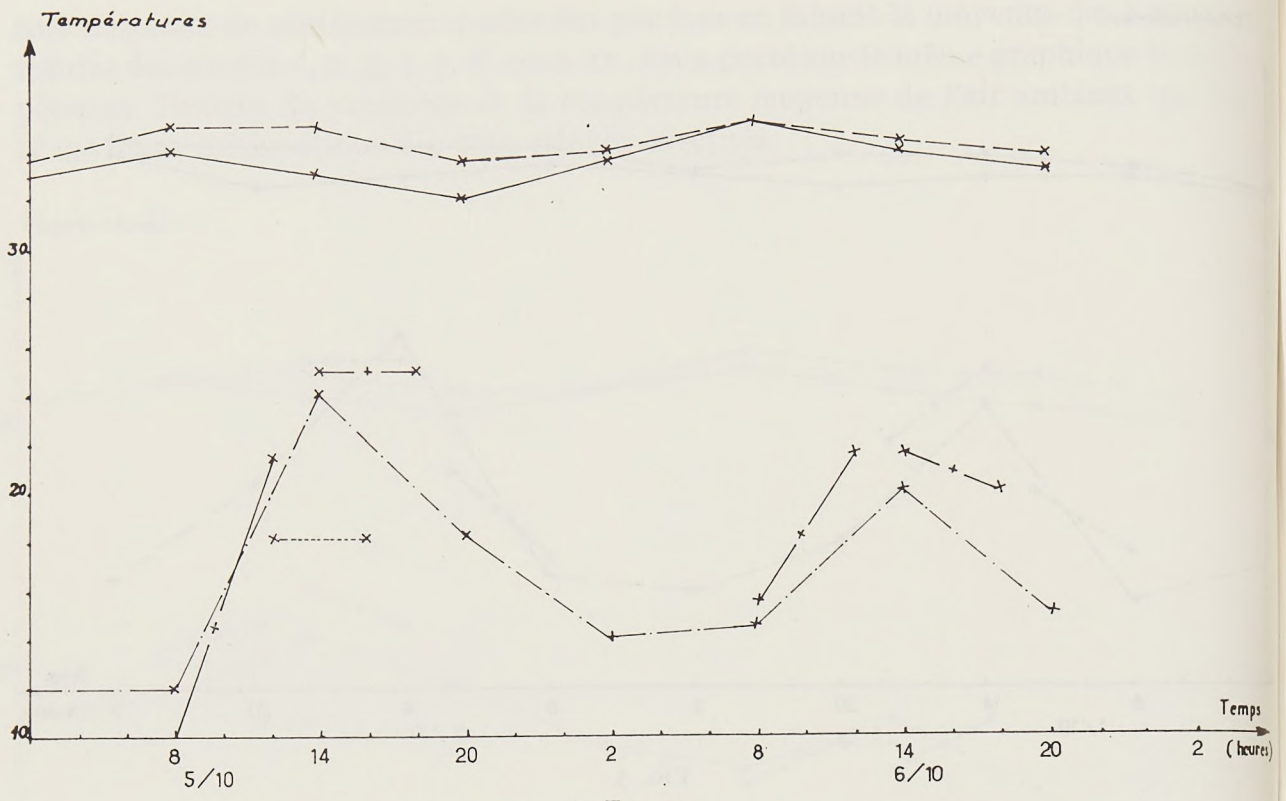


FIG. 7

FIG. 2, 3, 4, 5, 6, 7. — *Température moyenne du vinificateur ; température moyenne de l'air ; température entrée vendange ; points chauds de l'appareil ; température de l'eau de pulvérisation.*

On note une évolution périodique avec de faibles fluctuations de la température moyenne du vinificateur.

La température de l'air ambiant ne semble pas avoir d'influence immédiate ; on note une baisse de température au moment de l'entrée de la vendange fraîche qui coïncide souvent avec l'extraction de vin. La température d'entrée de vendange a une influence certaine sur la température moyenne du vinificateur.

Le matin après l'introduction de vendange fraîche suivie du soutirage de vin, les températures des points 2, 3 et 4 ne sont pas influencées et restent les points chauds de l'appareil.

Des sondages suivant la verticale en 1 et 1', dans la partie inférieure de l'appareil, donnent des températures semblables à celles enregistrées au soutirage de vin à la partie supérieure. On peut donc supposer qu'il y a des mouvements de convection suffisamment importants pour uniformiser la température de la vendange. Seul le fond de la cuve, où s'est accumulée une certaine épaisseur de dépôts et de pépins, est à une température légèrement plus basse (2°,5C au-dessous de la température de l'ensemble).

Les températures les plus élevées se trouvent dans le chapeau de marc dans la partie médiane non immergée : 33°C dans le marc pour un vin soutiré à 28°,7C.

L'enregistrement des températures du vinificateur en marche continue a montré que, dans ses conditions de fonctionnement et pour les conditions météorologiques de la campagne 1968, la température dans la vendange n'excédait jamais 35°C ; cette température a été atteinte durant la nuit suivant un après-midi où l'entrée de vendange a été la plus chaude (27°C en moyenne).

Il faut noter que pendant le remplissage de l'appareil on a enregistré des températures plus élevées qu'il est difficile de localiser, le dispositif de sondes thermométriques fixes, placé dans la partie inférieure de l'appareil, ayant cédé dès le début de la campagne, malgré les précautions qui avaient été prises.

L'efficacité du système de refroidissement par pulvérisation d'eau n'a pas pu être appréciée, car les températures ambiantes relativement fraîches pour la saison n'ont pas nécessité un fonctionnement prolongé du système. Il fut le plus souvent utilisé pendant peu de temps, entre 12 heures et 14 heures, au moment le plus chaud de la journée.

IV. — ESTIMATION DU SUCRE FERMENTÉ

Pour estimer la masse de sucre fermenté, on a admis que le volume de liquide en fermentation présent dans l'appareil était de 3 700 hl. En effet, lors de la vidange du fermenteur en fin de campagne, on a évacué 3 854 hl de vin. Les 154 hl de différence représentent approximativement le volume qu'occuperait le marc sec dans un chapeau de marc baignant dans le vin sur une hauteur de 1 mètre environ. Le volume de 3 700 hl, pris comme base de calcul, paraît donc assez vraisemblable.

Si :

A est la masse de sucre existant dans l'appareil dans un état final déterminé calculée par le produit de la teneur en sucre (en g/l) par la masse de vendange dans l'appareil ;

B la masse de sucre à l'état initial, calculée de la même manière 24 heures auparavant ;

C la masse de sucre introduite dans l'appareil durant cette période de 24 heures ;

D la masse de sucre retiré avec le vin évacué ;

on peut admettre que :

$$A - B = C - D$$

en l'absence de toute fermentation des sucres.

Si une masse de sucre « X » est fermentée durant cette période de 24 heures, on a :

$$A - B = C - D - X$$

La masse de sucre fermentée X est donc égale à :

$$X = B + C - (A + D)$$

De cette relation on peut déduire la masse de sucre fermentée par 24 heures et par unité de masse de vendange : $x = \frac{X}{M}$

M étant la masse totale de liquide en fermentation dans le vinificateur.

A partir de x, on peut calculer F, production théorique de chaleur : $F = \frac{24\,x}{180}$, dégagée au cours de la fermentation en supposant, comme cela est généralement admis, qu'une molécule-gramme de glucose (180 g) dégage 24 kcal.

4. 1. *Détermination de la masse de sucre introduite avec la vendange* (C)

Les dosages sont effectués sur le liquide seul. Or, on introduit de la vendange qui est une matière solide-liquide hétérogène. Il faut donc connaître le volume de liquide qui correspond à une masse de vendange déterminée.

Le sucre introduit a été estimé en admettant qu'il est égal au produit de la teneur volumique en sucre du moût par le volume de moût correspondant à la masse de vendange introduite. Ce volume a été obtenu en supposant que 122 kg de vendange correspondent à un volume de 100 l de jus. En effet, le rendement moyen de la cave, trouvé en fin de campagne, a été de 122 kg de vendange pour 1 hectolitre de vin produit ; le vin élaboré présente un degré alcoolique égal au degré mustimétrique mesuré sur le jus s'écoulant de la vendange foulée (le volume du liquide est estimé ici comme étant inférieur de 16 p. 100 à la masse de produit frais).

Une autre méthode consisterait à admettre un certain poids sec pour l'ensemble de la vendange introduite et à supposer que tout le reste correspond à un liquide dont la teneur en sucre est celle mesurée par la moyenne journalière réfractométrique. Le poids sec peut être pris égal à 5 p. 100 de la matière fraîche ; cette valeur résulte d'une étude expérimentale déjà réalisée sur le *Carignan* à la Station de Narbonne (Poux, 1965).

Pour avoir le volume correspondant au liquide contenu dans la matière fraîche, on doit diviser la masse de moût par la masse volumique de celui-ci, qui est d'environ 1,090 kg/dm^2. Ainsi, le volume de liquide peut être estimé comme étant inférieur de 14 p. 100 à la masse du produit frais.

Mais il faudrait, avec cette méthode, mesurer aussi le sucre retiré avec le marc pour évaluer le bilan de sortie des sucres ; or, on trouve 12 kg de marc pressé à à 60 p. 100 d'humidité environ par hl de vin produit, ce qui correspond à 250 g environ de sucre par hl de vin. Dans les 4 p. 100 de matière fraîche qui forment la différence entre les deux méthodes d'estimation, on peut penser qu'il y aurait 500 g de sucre environ. On voit donc que l'écart entre les deux méthodes est de 1 à 2 p. 100. Le chiffre de 18 p. 100 de la première méthode, qui paraît être très voisin de la réalité, a été adopté pour nos calculs.

4. 2. *Détermination de la masse de sucre retirée* (D)

D est le produit du volume de vin de goutte sorti de l'appareil par la teneur moyenne en sucre de ce vin. Les sucres ont été dosés dans le vin à la sortie.

Comme le vin à la sortie a une teneur en sucre variable, fonction de l'apport en sucre de la vendange, on a été amené à prendre comme teneur en sucre du vin à la sortie la moyenne des dosages effectués le matin et le soir (cf. tabl. 1).

Le bilan de la fermentation exprimant les quantités de sucres fermentés, calculés à l'aide de cette méthode, sont consignés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Bilan de la fermentation

Dates	Sucres				Consommé		Chaleur dégagée
	Final A (1)	Initial B (2)	Introduit C (3)	Sorti D (4)	Total appareil	*s* (5)	
	en grammes					g/kg	kcal/kg
27 sept.	14 763 000	9 731 000	24 904 085	5 582 720	14 289 365	38,6	5,13
28 sept.	14 356 000	14 763 000	25 479 671	4 463 480	21 423 191	57,9	7,70
29 sept.	13 653 000	14 356 000	23 944 427	5 581 080	19 066 347	51,5	6,84
30 sept.	11 729 000	13 653 000	23 842 212	6 070 500	19 695 712	53,2	7,07
1er oct.	11 433 000	11 729 000	22 099 367	4 348 575	18 046 792	48,7	6,47
2 oct.	10 360 000	11 433 000	20 282 060	3 924 180	17 430 880	47,1	6,26
3 oct.	14 504 000	10 360 000	28 137 785	5 987 150	18 006 635	48,6	6,46
4 oct.	13 468 000	14 504 000	23 256 988	5 287 100	19 005 888	51,3	6,82
5 oct.	11 877 000	13 468 000	23 954 378	5 827 665	19 717 713	53,2	7,07
6 oct. (6)	12 136 000	11 877 000	17 651 282	1 768 800	15 623 482	42,2	5,61
7 oct. (6)	1 102 600	12 136 000	11 561 824	1 131 900	21 463 324	58	7,71

(1) A Sucre final = Sucre restant (lendemain) × volume appareil (3 700 hectolitres).
(2) B Sucre initial = Sucre restant (matin) × volume appareil.
(3) C Sucre introduit = Sucre vendange (moyenne mustimétrique) × volume introduit (122 kg de vendange pour 1 hl).
(4) D Sucre sorti = Sucre vin (moyenne matin et soir) × volume retiré (vin de goutte + vin de presse).
Sucre consommé = — A — B — C + D.
(5) *s* Masse de sucre consommé par jour et par unité de masse de moût contenu dans le vinificateur (cf. § 4, 31).
(6) Résultats non utilisés dans l'estimation du bilan énergétique.

V. — ANALYSE DU BILAN ÉNERGÉTIQUE

5. 1. *Symboles*

Nous désignons par :

M : masse totale de liquide en fermentation dans le vinificateur (370 000 kg en moyenne)
Q : débit masse des divers produits (kg/jour)
C : chaleur massique des divers constituants (kcal/kg · °C)
θ : température (°C)
φ : quantité de chaleur mise en jeu par les divers produits, par rapport à 0°C (kcal/jour)
F : chaleur massique de fermentation (kcal/kg/jour)
S : surface d'échange du vinificateur (S = 230 m²)
K : coefficient global d'échange thermique au travers de la paroi du vinificateur (kcal/h · m² · °C)
s : masse de sucre transformé en alcool par kg de moût en fermentation contenue dans le vinificateur et par jour (kg/kg/jour)
τ : titre molaire d'une solution.

Les indices suivants sont relatifs à :

R : la vendange introduite journellement dans le vinificateur,
V : le vin soutiré journellement,
m : le marc non pressé, extrait journellement,
c : le CO_2 dégagé au cours de la fermentation,
e : l'eau évaporée et entraînée avec le CO_2,
al : l'alcool évaporé et entraîné avec le CO_2,
a : l'air ambiant autour du vinificateur.

5. 2. *Relation globale du bilan thermique*

Le bilan thermique quotidien est tel que :

— la somme de la chaleur de fermentation et de la quantité de chaleur de la vendange fraîche est égale à :

— la somme des quantités de chaleur du vin soutiré, du marc extrait, du CO_2 dégagé, des pertes par évaporation et des échanges thermiques au travers de la paroi;

soit donc :

$$M \cdot F + \varphi_R = \varphi_V + \varphi_m + \varphi_c + \varphi_e + \varphi_{al} + 24\ K\ S\ (\theta_V - \theta_a)$$

5. 3. *Expression des divers postes du bilan*

La détermination du bilan thermique suppose admis les raisonnements et valeurs suivants :

— Mises à part la chaleur de fermentation et les pertes par les parois, tous les autres postes du bilan sont par convention exprimés par rapport à une température de référence prise égale à 0°C.

— Les chaleurs massiques des différents constituants sont les suivantes :

$$C_V = C_R = 1 \text{ kcal/kg} \cdot {}^oC$$
$$C_m = 0{,}87 \text{ kcal/kg} \cdot {}^oC$$
$$C_c = 0{,}22 \text{ kcal/kg} \cdot {}^oC$$
$$C_e = 0{,}43 \text{ kcal/kg} \cdot {}^oC$$
$$C_{al} = 0{,}45 \text{ kcal/kg} \cdot {}^oC$$

Détermination de MF.

La chaleur massique F de fermentation est égale aux calories dégagées par litre de moût en fermentation et dont les valeurs sont réunies tableau 2.

La masse volumique du mélange contenu dans le vinificateur étant très voisine de l'unité, on peut déterminer la chaleur quotidienne totale de fermentation pour le produit MF.

Détermination de φ_R.

$$\varphi_R = Q_R \cdot C_R \cdot \theta_R.$$

La masse Q_R est la masse de vendange, déterminée à la cave.

Détermination de φ_V.

$$\varphi_V = Q_V \cdot C_V \cdot \theta_V.$$

La masse de vin de goutte Q_V a été également mesurée à la cave. Cette détermination est assez approximative puisqu'elle résulte du transvasement du vin dans des cuves qui n'ont pu être étalonnées rigoureusement.

Détermination de φ_m.

$$\varphi_m = Q_m \cdot C_m \cdot \theta_m.$$

La masse de marc non pressé extraite journellement est obtenue par la relation :

$$Q_R = Q_V + Q_m + Q_c + Q_e + Q_{al};$$

donc :

$$Q_m = Q_R - (Q_V + Q_c + Q_e + Q_{al}).$$

Détermination de φ_C.

$$\varphi_C = Q_C \cdot C_c \cdot \theta_c.$$

En raison des masses moléculaires du CO_2 et du glucose, on peut évaluer la masse de CO_2 dégagé à $\frac{88}{180}$ de la masse de sucre consommée au cours de la fermentation (cf. tabl. 2).

La chaleur φ_c est donc telle que :

$$\varphi_c = M \cdot s \cdot \frac{88}{180} \cdot 0{,}22 \cdot \theta_c \text{ (kcal/jour)}$$

Détermination de φ_e *et* φ_{al}.

Les pertes par évaporation sont évaluées en admettant que le CO_2 est saturé à la température θ_c par un mélange de vapeur d'eau et d'alcool éthylique.

La solution à partir de laquelle s'évaporent l'eau et l'alcool est supposée constituée en masse de 10 p. 100 d'éthanol et 90 p. 100 d'eau.

D'autre part, 180 g de sucre donnent 44,8 l de CO_2.

La chaleur de vaporisation de l'eau entre + 30 et + 35°C est de 580 kcal/kg.

La chaleur de vaporisation de l'éthanol dans une solution alcoolique est prise égale à 225 kcal/kg.

Il s'agit de déterminer les masses d'eau et d'alcool évaporées. Ces masses sont déterminées à partir des relations de Raoult en considérant successivement qu'il s'agit d'une solution aqueuse d'alcool puis d'une solution alcoolique d'eau.

Solution aqueuse d'alcool.

Le titre molaire de la solution τ_{al} est tel que :

$$\tau_{al} = \frac{n_{al}}{n_{al} + n_e} = 0{,}0416$$

où n est le nombre de molécules de chaque constituant contenues dans la solution.

Si p_e et p'_e sont les pressions de vapeur saturante en équilibre respectif avec l'eau pure et avec la solution à la même température on sait que, si la teneur en alcool est faible :

$$p_e - p'_e \simeq p_e \cdot k_e \cdot \tau_{al}$$

où k_e est la constante tonométrique de l'eau, $k_e = 1{,}02$.

$$p'_e = 0{,}9576 \cdot p_e$$

Pour une molécule-gramme de sucre, ou encore pour un volume de 44,8 litres de CO_2, la masse d'eau évaporée est :

$$2 \times 18 \times \frac{0{,}957\,6}{760}\, p_e \text{ (g/180 g de sucre)}$$

$$\text{soit } 0{,}2 \times \frac{0{,}9576}{760}\, p_e = 252 \cdot 10^{-6}\, p_e \ \frac{\text{kg}}{(\text{kg de sucre} \cdot \text{jour})}$$

La masse d'eau évaporée par jour est Q_e :

$$Q_e = M \cdot s \cdot 252 \cdot 10^{-6}\, p_e \text{ à la température } \theta_C$$

$$\text{ou } Q_e = 93{,}24 \cdot s \cdot p_e.$$

La chaleur latente mise en jeu quotidiennement par l'évaporation de l'eau est :

$$580 \times Q_e$$

A cette chaleur latente il faut ajouter la chaleur nécessaire pour amener la vapeur d'eau de 0 à la température θ_C soit :

$$Q_e \cdot C_e \cdot \theta_c = 0{,}43 \times Q_e \times \theta_c$$

La chaleur φ_e est donc :

$$\varphi_e = Q_e\,(580 + 0{,}43\ \theta_C) \text{ kcal/jour}$$

Solution alcoolique d'eau.

Le titre est τ_e tel que :

$$\tau_e = \frac{n_e}{n_e + n_{al}} = 0{,}958$$

Si p_{al} et p'_{al} sont les pressions de vapeur saturante d'alcool respectivement en équilibre avec l'alcool pur et la solution à la même température θ, on sait que :

$$p_{al} - p'_{al} = p_{al} \cdot k_{al} \cdot \tau_e$$

k_{al} constante tonométrique de l'alcool : $k_{al} = 1{,}013$

$$p'_{al} = 0{,}0296\, p_{al}$$

Par molécule-gramme de sucre ou par volume de 44,8 l de CO_2 dégagé, la masse d'alcool évaporé est :

$$2 \times 46 \times \frac{0{,}0296}{760}\, p_{al} \text{ (g/180 g de sucre)}$$

ou

$$2 \times 46 \times \frac{0{,}0296}{760} \times \frac{1\,000}{180}\, p_{al} = 199 \cdot 10^{-7} \cdot p_{al} \text{ (kg/kg sucre · jour)}$$

La masse d'alcool évaporée par jour est Q_{al}

$$Q_{al} = (M \cdot s \cdot 2 \cdot 46\, \frac{0{,}0296}{760} \cdot p_{al}) \text{ à la température } \theta_C$$

ou

$$Q_{al} = 7{,}363 \cdot s \cdot p_{al} \text{ kg/jour.}$$

La chaleur mise en jeu par l'évaporation est :

$$Q_{al} \cdot 225 \text{ (kcal/kg)}$$

La chaleur sensible pour amener la vapeur d'alcool de 0 à θ_C est :

$$Q_{al} \cdot C_{al} \cdot \theta_C = Q_{al} \cdot 0{,}45 \cdot \theta_C$$

La chaleur φ_{al} est donc :

$$\varphi_{al} = Q_{al}\,(225 + 0{,}45\,\theta_C) \text{ kcal/jour}$$

Détermination des pertes par les parois.

Les échanges thermiques au travers de la paroi du vinificateur sont évalués par la relation : $24 \cdot S \cdot K \cdot (\theta_V - \theta_a)$ pour 24 heures.

Dans cette relation K est le coefficient global d'échange thermique en surface. Compte tenu de l'épaisseur de la paroi et du grand diamètre du vinificateur, le coefficient K peut être estimé par la relation du mur plan étanche soit :

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{e}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}}$$

où :

α_1 est le coefficient de convection sur la face interne de la paroi ;

α_1 peut être estimé à 200 à 400 kcal/h · m² · °C.

α_2 est le coefficient de convection sur la face externe de la paroi ;

α_2 dépend essentiellement, dans ce cas, de la vitesse d'air autour du vinificateur.

Nous prendrons en moyenne $\alpha_2 = 10$ kcal/h · m² · °C, valeur correspondante à une vitesse d'air de l'ordre de 1,5 m/s.

e est l'épaisseur de la paroi ; e : 10 mm en moyenne ;
λ est le coefficient de conductibilité thermique de l'acier :

$$\lambda = 36 \text{ kcal/h} \cdot \text{m}^2/\text{m} \cdot {}^\circ\text{C}$$

$$\text{donc } K = \frac{1}{\frac{1}{400} + \frac{0{,}010}{36} + \frac{1}{10}}$$

D'après cette relation, on ne commet pas d'erreur grave en admettant que :

$$K \# \alpha_2 \# 10 \text{ kcal/h} \cdot \text{m}^2 \cdot {}^\circ\text{C}$$

VI. — RÉSULTATS ET DISCUSSION DU BILAN ÉNERGÉTIQUE

Les résultats expérimentaux sont présentés tableaux 3, 4, 4 *bis* et 5 et figure 8.
Dans le tableau 3, on a reporté les différentes valeurs des températures moyennes journalières relevées et des masses de substances mises en jeu.

TABLEAU 3

Relevés journaliers températures et masses de produits mises en jeu journellement

Dates	θ_a	θ_R	θ_V	$\theta_c = \theta_m$	Q_R	Q_V	Q_c	Q_e	Q_{al}	Q_m
	°C				kg/24 h					
27-9	19,3	22,0	31,5	35,4	159 324	128 000	6 987	158	31	854 839
28-9	15,4	16,6	31,2	35,2	162 071	96 800	10 476	232	46	1 918 998
29-9	16,6	17,7	29,7	33,7	149 730	104 300	9 323	192	37	1 209 089
30-9	17,2	18,8	29,6	33,6	149 936	122 700	9 631	198	38	583 598
1-10	16,2	20,4	30,8	34,8	138 193	114 100	8 824	191	38	523 392
2-10	17,3	20,2	31,1	35,1	125 351	105 600	8 524	189	37	386 135
3-10	16,8	20,8	31,8	35,8	180 011	144 200	8 805	204	40	993 880
4-10	16,0	21,5	32,5	36,5	147 090	115 900	9 294	220	43	789 604
5-10	16,1	20,3	33,2	37,2	149 792	120 900	9 642	238	46	705 535

N. B. Pour les symboles, se reporter § 5.1

Les tableaux 4 et 4 *bis* présentent les différents postes du bilan énergétique global ainsi que la somme des gains et des pertes. On note une assez bonne concordance entre les puissances thermiques globales reçues et perdues. Le rapport des gains aux pertes est compris, selon les journées entre 0,95 et 1,08. Il faut cependant observer que ce rapport n'est pas nécessairement une bonne expression de la qualité des mesures. En effet, la valeur de la température de référence, prise conventionnellement égale à 0°C pour le calcul de tous les postes élémentaires du bilan autres que

la chaleur de fermentation et la chaleur échangée par les parois du vinificateur influe sur la somme des chaleurs reçue et perdue.

TABLEAU 4

Bilan énergétique des pertes

Dates	φ_V	φ_m	φ_c	φ_e	φ_{al}	$24K \cdot S\ (\theta_V - \theta_a)$	Pertes
	kcal/24 h						
27-9	4 032 000	743 709	54 410	94 089	7 468	673 440	5 605 116
28-9	3 020 160	1 669 528	81 136	138 063	11 077	872 160	5 792 124
29-9	3 097 710	1 051 907	69 119	114 144	8 887	723 120	5 064 887
30-9	3 631 920	507 730	71 198	117 691	9 124	684 480	5 022 143
1-10	3 514 280	455 351	67 547	113 645	9 147	805 920	4 965 890
2-10	3 284 160	335 937	65 812	112 474	8 910	761 760	4 569 053
3-10	4 585 560	864 676	69 345	121 462	9 644	828 000	6 478 687
4-10	3 766 750	686 955	74 642	131 054	10 380	910 800	5 580 581
5-10	4 013 880	613 815	78 901	141 848	11 118	943 920	5 803 482

N. B. Pour les symboles, se reporter § 5. 1.

TABLEAU 4 *bis*

Bilan énergétique des gains

Dates	M. F.	φ_R	Gains	Gains / Pertes
	kcal/24 h			
27-9	1 898 100	3 505 128	5 403 230	0,96
28-9	2 849 000	2 690 579	5 539 380	0,96
29-9	2 530 800	2 650 221	5 181 020	1,02
30-9	2 615 900	2 818 797	5 434 700	1,08
1-10	2 393 900	2 819 137	5 213 040	1,05
2-10	2 316 200	2 532 090	4 848 290	1,06
3-10	2 390 200	3 744 230	6 134 430	0,95
4-10	2 523 400	3 162 435	5 685 835	1,02
5-10	2 615 900	3 040 778	5 656 680	0,97

On peut noter que les postes élémentaires du bilan global peuvent être répartis en quatre groupes :

Bilan énergétique de la fermentation : M. F.
Bilan énergétique de la vinification : $\varphi_R - \varphi_V - \varphi_C - \varphi_m$
Bilan énergétique des pertes de vinification : $\varphi_e + \varphi_{al}$
Bilan énergétique des échanges par les parois : $24\ K.\ S.\ (\theta_V - \theta_a)$

Les deux derniers bilans qui sont relatifs à des pertes pourraient, théoriquement, être éliminés ; il suffirait que le vinificateur idéalement isolé soit muni d'un piège à

eau et alcool parfaitement efficace. Le bilan de la fermentation serait alors exactement compensé par celui de la vinification.

Cette condition implique l'apparition dans le vinificateur d'une température d'équilibre θ_V très élevée incompatible avec l'activité des levures.

TABLEAU 5

Répartition du bilan énergétique global

Dates	$\frac{R - (V + C + m)}{M \cdot F}$	$\frac{e + al}{M \cdot F}$	$\frac{24 \cdot K \cdot S \cdot (\theta_V - \theta_a)}{M \cdot F}$	Somme des colonnes 1, 2 et 3
27-9	0,698	0,051	0,355	1,104
28-9	0,730	0,052	0,306	1,088
29-9	0,620	0,049	0,286	0,955
30-9	0,532	0,048	0,262	0,842
1-10	0,509	0,051	0,337	0,897
2-10	0,498	0,052	0,329	0,879
3-10	0,743	0,055	0,346	1,144
4-10	0,541	0,056	0,400	0,997
5-10	0,637	0,058	0,361	1,056
Moyennes	0,612	0,052	0,331	0,995

N. B. Pour les symboles, se reporter § 5. 1.

En d'autres termes, il convient d'assurer l'élimination d'une certaine fraction de la chaleur de fermentation. Pour apprécier cette fraction on a présenté, tableau 5, les rapports suivants :

$$\text{Colonne 1} : \frac{\varphi_R - \varphi_V - \varphi_C - \varphi_m}{M \cdot F \cdot}$$

$$\text{Colonne 2} : \frac{\varphi_e + \varphi_{al}}{M \cdot F \cdot}$$

$$\text{Colonne 3} : \frac{24\ K \cdot S \cdot (\theta_V - \theta_a)}{M \cdot F \cdot}$$

La figure 8 représente ces rapports en fonction du temps.

En moyenne, le rapport de la chaleur de vinification représente 61,2 p. 100 de la chaleur de fermentation, celui des pertes d'eau et d'alcool 5,2 p. 100 et celui des échanges par les parois 33,1 p. 100.

La chaleur d'évaporation d'eau et d'alcool traduit une certaine perte d'alcool. Celle-ci est faible ; elle a été en moyenne de 40 kg par 24 heures ; elle représente $\frac{40}{117\,000}$ soit $\frac{34}{10\,000}$ de la masse de vin soutiré.

Cette perte serait d'autant plus forte que la vinification serait conduite à plus haute température et que la teneur en alcool du vin serait plus élevée.

Si l'on désirait limiter cette perte, il faudrait que le débit de CO_2 saturé en eau et alcool soit refroidi de façon à condenser la majeure partie des vapeurs entraînées.

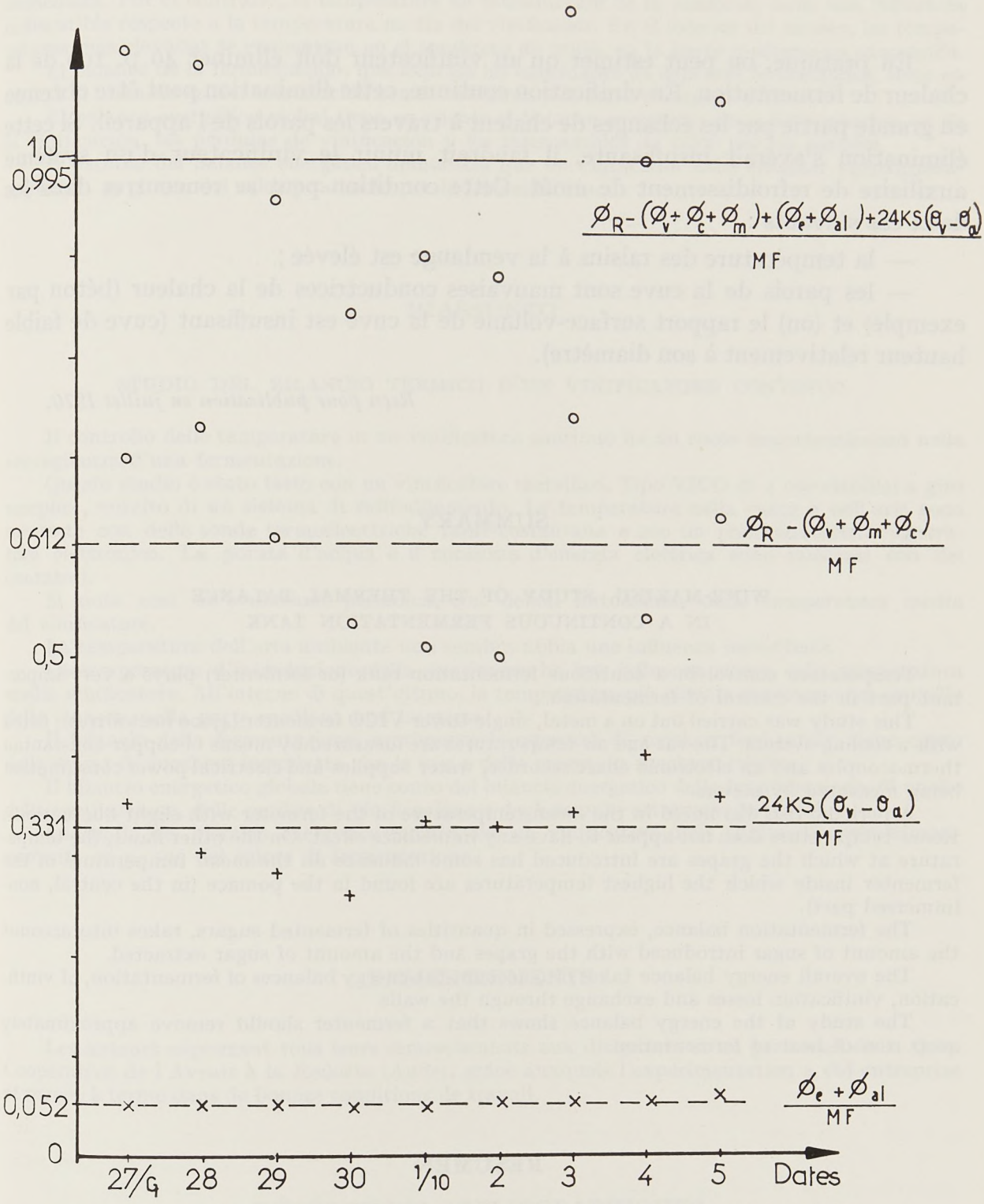


FIG. 8. — *Expression des bilans par rapport à la chaleur de fermentation M. F.*

VII. — CONCLUSION

En pratique, on peut estimer qu'un vinificateur doit éliminer 40 p. 100 de la chaleur de fermentation. En vinification continue, cette élimination peut être obtenue en grande partie par les échanges de chaleur à travers les parois de l'appareil. Si cette élimination s'avérait insuffisante, il faudrait munir le vinificateur d'un système auxiliaire de refroidissement de moût. Cette condition peut se rencontrer dans les deux cas suivants :

— la température des raisins à la vendange est élevée ;

— les parois de la cuve sont mauvaises conductrices de la chaleur (béton par exemple) et (ou) le rapport surface-volume de la cuve est insuffisant (cuve de faible hauteur relativement à son diamètre).

Reçu pour publication en juillet 1970.

SUMMARY

WINE-MAKING. STUDY OF THE THERMAL BALANCE IN A CONTINUOUS FERMENTATION TANK

Temperature control in a continous fermentation tank (or fermenter) plays a very important part in the control of fermentation.

This study was carried out on a metal, single-tower VICO fermenter (4,000 hectolitres), fitted with a cooling-system. The vat and air temperatures are measured by means of copper-constantan thermocouples and an electronic chart recorder, water supplies and electrical power consumption being measured by meters.

A periodic rise was noted in the mean temperature of the fermeter with slight fluctuations. Room temperature does not appear to have any immediate effect. On the other hand, the temperature at which the grapes are introduced has some influence on the mean temperature of the fermenter inside which the highest temperatures are found in the pomace (in the central, non-immersed part).

The fermentation balance, expressed in quantities of fermented sugars, takes into account the amount of sugar introduced with the grapes and the amount of sugar extracted.

The overall energy balance takes into account the energy balances of fermentation, of vinification, vinification losses and exchange through the walls.

The study of the energy balance shows that a fermenter should remove approximately 40 p. 100 of heat of fermentation.

RESUMEN

ESTUDIO DEL BALANCE TERMICO DE UN VINIFICADOR CONTINUO

El control de las temperaturas en un vinificador continuo desempeña un papel muy importante en la vigilancia de una fermentación.

Este estudio ha sido llevado a cabo mediante un vinificador metálico, tipo VICO, de 4 000 hectólitros, de simple vuelta, dotado de un sistema de enfriamiento. Las temperaturas en la cuba y en el aire son medidas por medio de sonda termoelétricas cobre-constantán y un potentiómetro

registrador electrónico. Los caudales de agua y los consumos de energia eléctrica son medidos por medio de contadores.

Se advierte de este modo una evolución periódica, con fluctuaciones reducidas, de la temperatura media del vinificador. La temperatura del aire ambiente no parece tener ninguna influencia immediata. Por el contrario, la temperatura de introducción de la vendimia tiene una influencia indiscutible respecto a la temperatura media del vinificador. En el interior del mismo, las temperaturas más elevadas se encuentran en el sombrero de orujo, en la parte mediano no sumergida.

El balance de la fermentación, que expresa las cantidades de azúcares fermentados, tiene en cuenta la masa de azúcar introducida con la vendimia y la masa de azúcar retirada.

El balance energético global tiene en cuente el balance energético de la fermentación, el de la vinificación, las pérdidas de vinificación y los intercambios de calor por las paredes.

El estudio del balance energético demuestra que un vinificador debe eliminar aproximadamente un 49 p. 100 del calor producido por la fermentación.

RIASSUNTO

STUDIO DEL BILANCIO TERMICO D'UN VINIFICATORE CONTINUO

Il controllo delle temperature in un vinificatore continuo ha un ruolo importantissimo nella sorveglianza d'una fermentazione.

Questo studio è stato fatto con un vinificatore metallico, Tipo VICO di 4 000 ettolitri a giro semplice, munito di un sistema di raffreddamento. Le temperature nella vasca e nell'aria sono misurate con delle sonde termoélecttriche rame-costantana e con un potentziometro registratore elettronico. La porata d'acqua e il consumo d'energia elettrica sono musirati con dei contatori.

Si nota cosi' un'evoluzione periodica, con deboli flutuazioni, della temperatura media del vinificatore.

La temperatura dell'aria ambiente non sembra abbia une influenza immediata.

La temperatura d'introduzione della uve invece ha une influenza sicura sulla temperatura media vinificatore. All'interno di quest'ultimo, la temperatura più elevate si trovano nel cappello delle vinacce, nella parte mediana non immersa.

Il bilancio della fermentazione, esprimente le quantità di zuccheri fermentati, tiene conto della massa di zucchero introdotta con le uve e della massa du zucchero ritirata.

Il bilancio energetico globale tiene conto del bilancio energetico della fermentazione, di quello della vinificazione, delle perdite di vinificazione e degli scambi attraverso le pareti.

Lo studio del bilancio energetico mostra che un vinificatore deve eliminare approssimativamente 40 p. 100 del calore di fermentazione.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment tous leurs remerciements aux dirigeants et au personnel de la Cave Coopérative de l'Avenir à la Redorte (Aude), grâce auxquels l'expérimentation a été entreprise et menée à terme dans de bonnes conditions de travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Flanzy M., Bouzigues Mme L., Bouzigues H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfochromique. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 397-415.

Poux C., 1965. Le raisin mûr. *Bull. techn. Inform.*, (196), 51-54.

Sémichon L., Flanzy M., 1926. Recherches sur la défécation des jus sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Falsif. Fraudes*, **19**, 208-226.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (2), 177-179.

NOTE

MISE EN ÉVIDENCE DU LAIT DE VACHE DANS LE FROMAGE DE CHÈVRE PAR ÉLECTROPHORÈSE DE LA FRACTION CASÉINE. CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Alice PIERRE et A. PORTMANN

Laboratoire de Technologie laitière, 17 - Surgères
Institut national de la Recherche agronomique

Dans notre précédente note (PIERRE et PORTMANN, 1970), nous signalions l'importance du stade de maturation dans l'application de l'électrophorèse à la détection et au dosage de l'addition frauduleuse du lait de vache. Nous faisions remarquer que les échantillons prélevés au moment où ils sont mis en vente sur le marché permettaient d'obtenir des résultats très satisfaisants. Toutefois, les échantillons doivent être soit analysés très rapidement après le prélèvement, soit conservés à — 15°C, température à laquelle on peut différer l'analyse pendant un temps indéfini.

Lors du prélèvement effectué par le Service de la Répression des Fraudes, le règlement prévoit que plusieurs échantillons sont saisis et mis en bocaux ; l'un est envoyé au laboratoire d'analyse qui dispose habituellement des moyens de le conserver à basse température, mais les autres échantillons, qui doivent éventuellement être mis à la disposition des experts, sont pratiquement toujours conservés à la température ambiante pendant une durée qui, souvent, peut atteindre un an ou plus.

Il est bien connu que, dans ce cas, les échantillons sont dans un état de dégradation totale au moment où ils doivent être analysés et il est impossible de retrouver assez de caséine intacte pour effectuer des épreuves d'électrophorèse valables.

Aussi avons-nous entrepris d'étudier le moyen de conserver les échantillons de fromage à la température ambiante dans des conditions telles que, même après plusieurs mois, l'analyse électrophorétique de la fraction caséine soit possible. Après quelques essais, nous avons adopté la conservation dans l'alcool éthylique à 95 p. 100.

Les expériences ont été effectuées avec des fromages de chèvre achetés chez les commerçants, par conséquent dans l'état où ils sont proposés au consommateur. Nous avons effectué l'analyse des fromages par électrophorèse aussitôt après le prélèvement, puis une moitié de chaque échantillon a été mise dans des bocaux contenant de l'alcool à 95 p. 100 en quantité suffisante pour que les échantillons soient recouverts par l'alcool, l'autre moitié étant placée dans des bocaux ne contenant pas d'alcool. Les échantillons ont été analysés à nouveau après 5 et 12 mois de conservation à température ambiante. Sur la figure 1, on voit que l'échantillon de fromage conservé dans l'alcool a gardé son aspect primitif alors que le témoin est fortement dégradé.

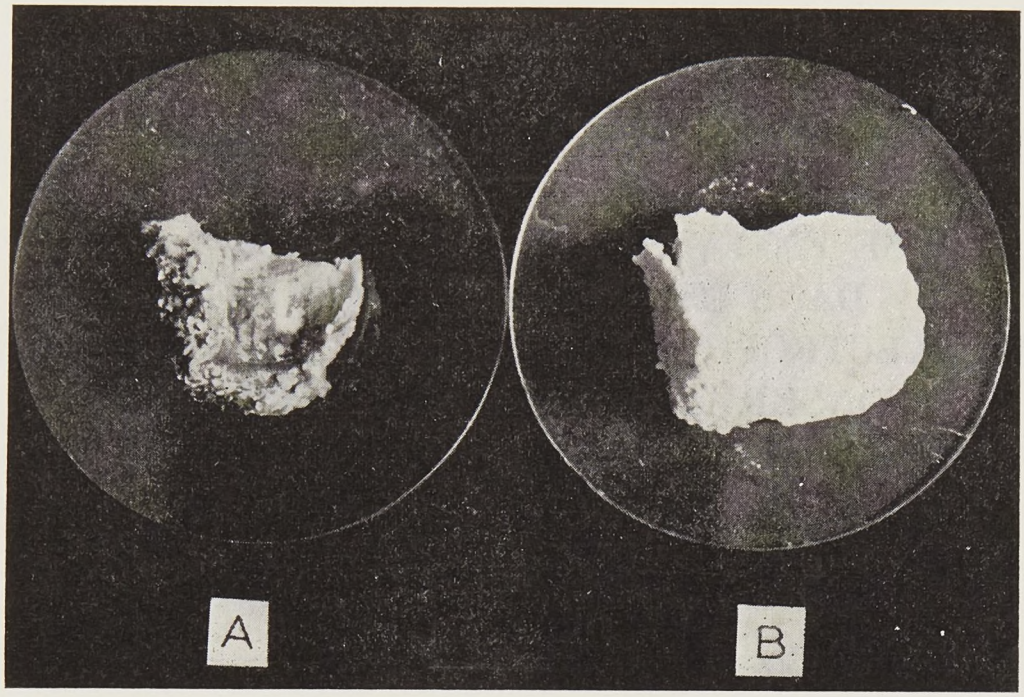


FIG. 1. — *Fromage de chèvre conservé pendant 5 mois à 20°C*
A. Échantillon témoin. B. Échantillon conservé dans l'alcool

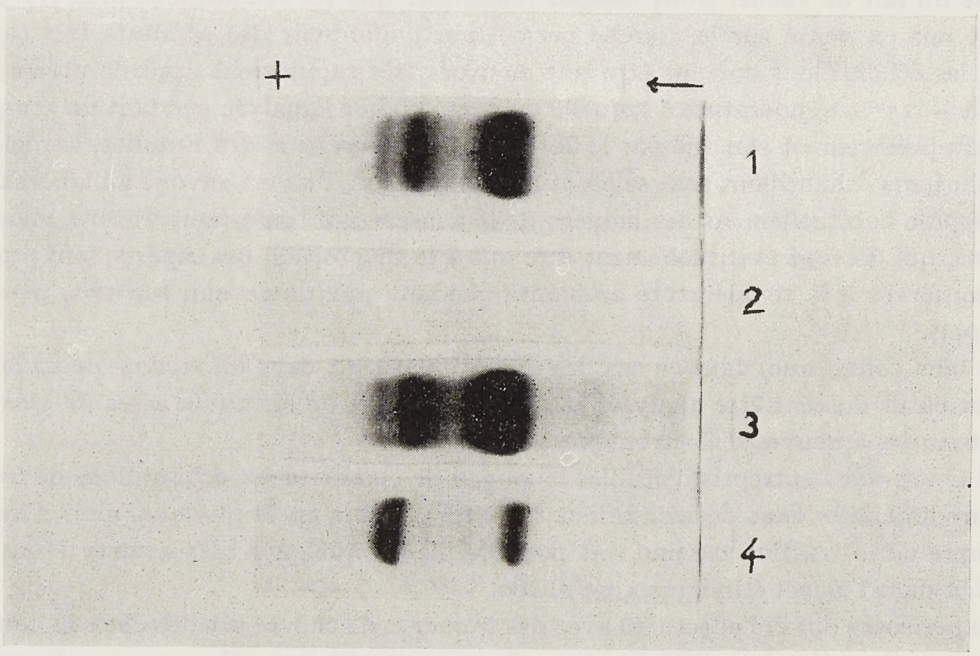


FIG. 2. — *Analyse en gel de polyacrylamide de la fraction insoluble à pH 4.6 d'un fromage*
1. au moment du prélèvement ; 2. après 5 mois de conservation (témoin) ; 3. après 5 mois de conservation dans l'alcool ; 4. caséine de vache

La figure 2 montre l'électrophorèse effectuée d'une part sur l'échantillon de fromage avant conservation et, d'autre part, après conservation pendant 5 mois avec ou sans alcool ; l'électrophorégramme de la fraction de fromage conservée dans l'alcool montre une bande de caséine α_{s_1} de vache très nette alors qu'il n'y a plus de bandes électrophorétiques détectables dans la fraction de fromage conservée sans alcool.

Dans le tableau 1, nous avons indiqué les teneurs en lait de vache trouvées dans les fromages avant et après conservation dans l'alcool. On voit que les différences entre les teneurs en lait de vache trouvées après 5 mois restent dans les limites de précision de la méthode. Après 12 mois, on trouve pour les échantillons 6 et 8 une valeur inférieure à la valeur initiale mais encore très caractéristique de la fraude ; pour les 7 autres échantillons, les valeurs sont satisfaisantes.

TABLEAU I

Recherche du lait de vache effectuée sur des échantillons de fromage avant et après conservation dans l'alcool

N° de l'échantillon de fromage	Proportion de protéines de lait de vache trouvée dans les fromages (en p. 100 des protéines totales)		
	Avant conservation	Après conservation dans l'alcool pendant :	
		5 mois	12 mois
1	28	28	21
2	23	22	16
3	42	43	45
4	15	13	14
5	0	0	0
6	35	39	25
7	26	32	22
8	32	37	12
9	0	0	0
10	2 à 3	2 à 3	0

Cet essai montre qu'il est possible d'appliquer la méthode électrophorétique à des échantillons conservés plusieurs mois à la température ordinaire (près de 20°C) ; ce procédé permettra donc aux experts d'effectuer la recherche du lait de vache sur des échantillons en bon état.

Nous poursuivons notre étude sur des fromages fabriqués au laboratoire et dans la composition desquels entrent des quantités connues de lait de vache et de chèvre.

Reçu pour publication en avril 1970.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PIERRE Alice, PORTMANN A. 1970. Emploi de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide pour mettre en évidence et doser le lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas des fromages. *Ann. Technol. agric.*, **19** (2), 107-130.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *: Résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* en anglais destiné à être traduit comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12,4 photos 9 × 5,5 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Technologie agricole.

Le Directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 10-1970

Dépôt légal: 4e trimestre 1969. N° d'impression: 1264.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 19 1970 NUMÉRO 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (3), 187-196.

ACTION DU SUBSTRAT CARBONÉ SUR L'OXYDATION DE L'ÉTHANOL ET DE L'ACÉTALDÉHYDE PAR *ACETOBACTER ACETI*

C. DIVIES
avec la collaboration technique de C. SCHNEIDER

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

On a mesuré l'activité d'oxydation pour l'éthanol et l'acétaldéhyde d'*A. aceti* NCIB 8554 prélevé au cours de sa phase exponentielle de croissance sur un milieu minimum avec, comme substrats carbonés, l'éthanol, l'acétate, le lactate et le mélange glucose-alanine à la concentration de 0,08 M.

Les cellules ayant poussé sur éthanol présentent une activité d'oxydation pour l'éthanol et l'acétaldéhyde plus importante que les cellules obtenues à partir d'acétate, de lactate, ou de glucose-alanine. Sur les extraits enzymatiques, on a constaté que l'éthanol déshydrogénase insoluble est la plus inductible, l'acétaldéhyde déshydrogénase insoluble l'est à un degré moindre ; il en est de même pour l'éthanol déshydrogénase soluble fonctionnant avec le NAD et les acétaldéhyde déshydrogénases solubles fonctionnant respectivement avec le NAD et avec le NADP.

Dans la discussion, on envisage notamment le rôle des deux aldéhyde déshydrogénases solubles au regard du métabolisme des substrats carbonés utilisés.

INTRODUCTION

Il est maintenant bien établi qu'il existe deux voies d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde chez les bactéries acétiques (PRIEUR, 1957, 1960 ; DE LEY, 1960 ; NAKAYAMA, 1960, 1961 ; DUPUY et MAUGENET, 1962). L'un des systèmes se retrouve dans l'extrait soluble du broyat bactérien il : comprend les alcool et les aldéhyde déshydrogénases solubles qui sont couplées au NAD et au NADP.

L'autre système, insoluble, est situé sur la membrane cytoplasmique des bactéries et met en jeu ce que GREEN (1956) appelle des particules transporteuses d'électrons sans qu'interviennent des coenzymes solubles. Ces particules sont capables d'effectuer la réaction :

$$CH_3 - CH_2OH + O_2 \rightarrow CH_3 - COOH + H_2O$$

DIVIES et DUPUY (1970) ont montré que l'acétaldéhyde est un intermédiaire pour cette réaction globale facilement libéré dans le milieu. Il faut donc considérer cette réaction comme la somme de deux réactions successives catalysées par l'éthanol déshydrogénase et l'acétaldéhyde déshydrogénase insolubles.

Nous savons depuis les travaux de RAO et GUNSALUS (1955) que chez *A. aceti*, l'éthanol déshydrogénase soluble fonctionne avec le NAD, alors qu'il existe deux aldéhyde déshydrogénases couplées au NAD et au NADP. A cet égard, *A. aceti* apparaît différent de *A. dioxyacetonicus* (KIDA et ASAI, 1968) qui possède une éthanol et une acétaldéhyde déshydrogénase couplées au NADP. Pour TANNENBAUM (1956), l'éthanol déshydrogénase soluble chez *A. peroxydans* est couplée au NADP, non au NAD comme l'a montré ATKINSON (1956).

Il nous a paru intéressant de voir dans quelle mesure la constitution enzymatique d'*A. aceti*, en culture sur différents substrats carbonés, pouvait varier et quel pouvait être le rôle des différentes déshydrogénases.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé pour cette étude une souche d'*Acetobacter aceti* NCIB 8554 que nous a fournie le professeur ETTLINGER ((Microbiol. Inst. Zürich). Le milieu de culture de base est identique au milieu utilisé par MONARD *et al.* (1967).

Les différentes sources de carbone utilisées sont :

a) Éthanol ..... 0,08 M
b) Acide acétique ..... 0,08 M
c) Acide lactique ..... 0,08 M
d) Glucose-alanine ..... 0,08 M de chaque substrat carboné glucose et alanine.

Le milieu de culture de base est stérilisé 20 minutes à 110°C, les substrats carbonés qui sont déjà stériles sous la forme commerciale (éthanol, acide acétique, acide lactique) sont ajoutés après la stérilisation du milieu de base. Le glucose est stérilisé séparément. L'alanine est stérilisée avec le milieu de base.

Les fioles de culture sont placées sur un agitateur du type rotatif, tournant à 240 tours/mn, le rapport entre le volume total du flacon et le volume du liquide est de 10. Dans ces conditions, le coefficient d'oxydation mesuré dans une solution de sulfite est de 38 mM d'O_2 par litre et par heure (SCHULTZ et GADEN, 1956).

Les cellules prélevées après 24 heures de culture sont en phase exponentielle.

La séparation des bactéries non proliférantes est effectuée selon la méthode utilisée par DIVIES et DUPUY (1969).

Les modalités de préparation des enzymes insolubles et solubles sont celles utilisées par DUPUY et MAUGENET (1962).

Les mesures d'activité ont été effectuées pour les bactéries et les enzymes insolubles au respiromètre Gilson, à 28°C, en présence d'une quantité saturante d'éthanol ou d'acétaldéhyde ($5 \cdot 10^{-2}$M), les activités ont été exprimées pour les bactéries en µl O_2/mg de poids sec et par heure, pour les enzymes insolubles en µl O_2/mg d'azote et par heure.

Pour les enzymes solubles, les mesures sont effectuées sur une solution de 3,2 ml contenant : 1 ml d'extrait enzymatique soluble à la concentration voisine de 3 mg/ml de protéines ; 2 ml de tampon phosphate 0,2 M à pH = 8,5 ; 0,1 ml d'éthanol 5 M ou d'acétaldéhyde 5 M ; 0,1 ml d'une solution contenant 5 mg/ml de NADP ou 4,7 mg/ml de NAD. La réaction est effectuée à 28°C et sa vitesse mesurée par la différence de densité optique à 340 nm pendant 30 secondes après 30 secondes de réaction. Une correction des mesures a été nécessaire car les extraits enzymatiques contiennent une activité $NADH_2$ oxydase. Pour cela, on a introduit dans la solution enzymatique sans substrat 0,05 ml d'une solution à 5 mg/ml de $NADH_2$. Les résultats sont exprimés en Δ D. O. $\times$ 100/h et par mg de protéines.

L'azote total des extraits enzymatiques est déterminé par la technique de LUBOCHINSKY *et al.* (1954). La teneur en protéines a été estimée à 6,25 fois la teneur en azote.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. — *Oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par les cellules entières*

a) *Oxydation de l'éthanol.*

Nous constatons (tabl. 1) que les cellules cultivées sur éthanol présentent une activité d'oxydation de l'éthanol plus importante que les cellules ayant poussé sur acétate, lactate et glucose-alanine. Cette activité constante de pH = 5 à 7,7 pour les cellules cultivées sur éthanol présente un maximum plus accentué à pH = 5,5 — 6,0 pour les cellules obtenues à partir des autres substrats.

TABLEAU I

*Activité d'oxydation de l'éthanol pour les cellules entières d'*Acetobacter aceti *après leur croissance sur différents substrats carbonés*

Q_{O_2} des cellules entières provenant de culture sur :	pH de mesure						
	3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	7,0	7,7
Éthanol	230	416	884	876	850	784	810
Acétate	113	250	565	588	541	357	112
Lactate	128	276	456	466	571	374	289
Glucose-alanine ...	102	117	306	319	306	262	189

Les mesures de Q O_2 ont été exprimées en µl O_2/heure et par mg de poids sec. Éthanol à la concentration de $5 \cdot 10^{-2}$ M. Tampon tartrate-phosphate 0,1 M de pH = 4 à 7. Tampon phosphate 0,1 M à pH = 3,5 et 7,7. 0,2 ml de KOH à 20 p. 100 dans la cupule centrale.

b) *Oxydation de l'acétaldéhyde.*

On observe (tabl. 2) une activité d'oxydation de l'acétaldéhyde beaucoup plus élevée que pour l'éthanol (tabl. 1). Nous avons constaté pour *Acetobacter rancens*, par exemple, que le QO_2 pour l'éthanol et l'acétaldéhyde étaient voisins (résultats non publiés). Nous constatons aussi, pour tous les types de cellules, que l'activité d'oxydation de l'acétaldéhyde est sensiblement constante de pH = 5,0 à 7,7. Entre les différents types de cellules on observe des différences dans l'oxydation de l'acétaldéhyde.

II. — *Oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par l'extrait insoluble*

a) *Éthanol déshydrogénase insoluble.*

A la différence de ce que montrent les cellules entières (tabl. 1), on obtient pour les extraits acellulaires (tabl. 3) une plus forte différence d'activité suivant le substrat carboné de la culture. A pH = 5,0 cette diminution est supérieure à 83 p. 100 pour

TABLEAU 2

*Activité d'oxydation de l'acétaldéhyde pour les cellules entières d'*A. aceti *après leur croissance sur différents substrats carbonés*

Q_{O_2} des cellules entières provenant de culture sur :	pH de mesure						
	3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	7,0	7,7
Éthanol	1 770	2 345	2 465	2 560	2 560	2 670	2 580
Acétate	1 074	1 575	1 717	1 690	1 770	1 735	1 690
Lactate	1 615	1 410	1 615	1 770	1 970	2 006	2 600
Glucose-alanine ...	731	940	987	1 030	1 070	1 050	946

Acétaldéhyde à la concentration de $5 \cdot 10^{-2}$ M. Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience du tableau 1.

TABLEAU 3

Activité d'oxydation de l'éthanol pour l'éthanol déshydrogénase insoluble des cellules après leur croissance sur différents substrats carbonés

Q_{O_2} de l'éthanol déshydrogénase obtenu après culture sur :	pH de mesure						
	3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	7,0	7,7
Éthanol	143	700	820	727	328	86	43
Acétate		94	107	90,5	60	4	—
Lactate	12,6	54,5	76	64	16,8	—	—
Glucose-alanine ...	18	24	44	20	18	14	—

Les mesures ont été exprimées en Q_{O_2} = µl O_2/mg d'azote. Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience du tableau 1.

TABLEAU 4

Activité d'oxydation de l'acétaldéhyde pour l'acétaldéhyde déshydrogénase insoluble des cellules après leur croissance sur différents substrats carbonés

Q_{O_2} pour l'acétaldéhyde déshydrogénase insoluble obtenue après culture sur :	pH de mesure						
	3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	7,0	7,7
Éthanol	3 860	4 500	4 700	4 950	5 300	5 060	4 150
Acétate	—	2 000	2 100	2 150	2 480	2 600	2 040
Lactate	1 570	1 610	1 840	1 990	2 090	1 680	1 180
Glucose-alanine ...	1 300	1 630	1 800	2 080	2 080	1 720	1 260

Les mesures sont exprimées en Q_{O_2} = µl O_2/mg d'azote et par heure. Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience du tableau 1.

TABLEAU 5

*Activité de l'éthanol déshydrogénase et des aldéhyde déshydrogénases solubles d'*Acetobacter aceti *après culture sur différents substrats carbonés*

Enzymes solubles obtenues à partir de bactéries ayant poussé sur :	Éthanol déshydrogénase couplée au NAD	Éthanol déshydrogénase couplée au NADP	Aldéhyde déshydrogénase couplée au NAD	Aldéhyde déshydrogénase couplée au NADP	Rapport de l'activité: Aldéhyde déshydrogénase couplée au NADP / Aldéhyde déshydrogénase couplée au NAD
Éthanol.....	314	27	450	1 150	2,65
Acétate	220	22	344	602	1,75
Lactate	269	34	401	533	5,1
Glucose-alanine·	178	33	401	1 550	3,8

Les résultats sont exprimés en ΔD.O. × 100/mg protéines et par heure à 340 nm ; les conditions expérimentales sont données dans le paragraphe « matériel et méthodes ».

les extraits obtenus à partir d'acétate, de lactate ou de glucose-alanine par rapport aux extraits obtenus à partir d'éthanol.

b) *Aldéhyde déshydrogénase insoluble.*

L'aldéhyde déshydrogénase insoluble (tabl. 4) présente un pH optimum de 6,0 alors que celui pour l'éthanol déshydrogénase insoluble est de 5,0. Enfin, l'activité des extraitsa cellulaires obtenus à partir d'acétate, lactate et glucose-alanine est voisine de 50 p. 100 de l'activité des extraits obtenus à partir d'éthanol.

III. — *Éthanol et acétaldéhyde déshydrogénases solubles* (tabl. 5)

Les mesures que nous avons effectuées sur les extraits enzymatiques nous ont montré que la souche d'*Acetobacter aceti* étudiée possédait une activité éthanol déshydrogénase liée au NAD ; la faible activité liée au NADP que nous avons portée dans le tableau 5 est sensiblement constante pour les quatre extraits enzymatiques ; nous attribuons cette activité à la présence d'éthanol déshydrogénase insoluble dans l'extrait d'enzymes solubles, car une purification partielle des enzymes solubles par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium supprime cette activité.

Pour l'acétaldéhyde déshydrogénase nous avons observé conformément aux résultats de Rao et Gunsalus (1955) deux acétaldéhydes déshydrogénases, l'une couplée au NAD et l'autre couplée au NADP.

DISCUSSION ET CONCLUSION

De manière à faciliter la discussion, nous avons résumé, figure 1, le catabolisme des substrats carbonés utilisés d'après les études de Stouthamer (1960), Monard *et al.* (1967) sur le métabolisme du glucose et De Ley et Schell (1962) sur le métabolisme du lactate.

Les mesures enzymatiques effectuées sur les extraits bruts appellent quelques remarques. L'oxydation de l'éthanol implique aussi l'oxydation de l'acétaldéhyde en acide acétique puisque nous n'avons pas interrompu la réaction au stade acétaldéhyde, mais, en opérant avec une quantité saturante d'éthanol et de coenzymes, la vitesse de transformation mesurée est proportionnelle à la concentration en alcool déshydrogénase. Nous avons été amenés à faire la correction de mesure $NADH_2$ oxydase ; cette correction est rendue possible car la disparition de $NADH_2$ est linéaire au cours du temps pour l'intervalle de concentration étudié. Enfin, l'action des phosphates qui peuvent exister est négligeable puisqu'on n'observe pas de formation notable de NADP dans le milieu qui comprend un excès de phosphate ; en effet, il n'y a pas d'oxydation de l'alcool déshydrogénase liée au NADP alors qu'on observe celle de l'alcool déshydrogénase liée au NAD ; cette dernière réaction est donc bien spécifique du NAD qui reste en quantité saturante dans le milieu.

Pour la souche étudiée, *A. aceti*, on observe une activité d'oxydation de l'acétaldéhyde nettement plus importante que celle obtenue pour l'éthanol, que ce soit pour les cellules entières ou bien pour les extraits acellulaires solubles et insolubles.

Nous constatons que les éthanol et acétaldéhyde déshydrogénases sont des

enzymes partiellement inductibles pour *A. aceti* : pour l'oxydation de l'éthanol, les mesures faites sur les cellules entières à pH = 5 montrent une diminution d'activité de 36 p. 100, 48,5 p. 100, 65,2 p. 100 si le substrat carboné de culture est l'acétate, le lactate ou le glucose à la place de l'éthanol ; le QO_2 est diminué de 86 p. 100, 63,5 p. 100 et 76,2 p. 100 à pH = 7 ; sur les extraits enzymatiques insolubles à pH = 5, on observe une diminution de 87 p. 100, 90,7 p. 100, 94,7 p. 100 pour ces mêmes substrats par rapport à l'éthanol ; pour l'éthanol déshydrogénase soluble, cette activité diminue de 30 p. 100, 14,5 p. 100 et de 43,3 p. 100.

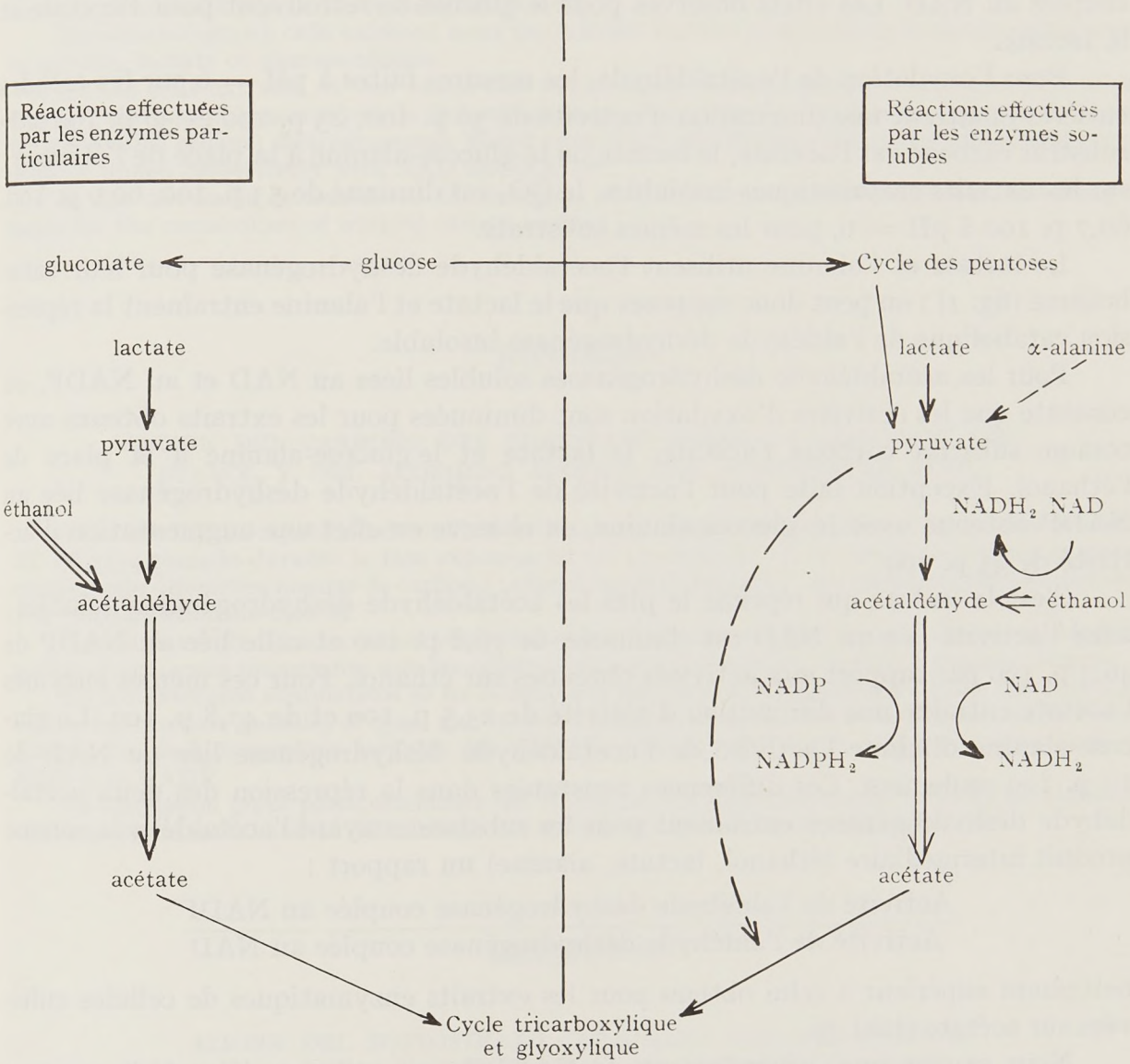


FIG. 1. — *Résumé synoptique du catabolisme par* A. aceti *des substrats carbonés utilisés*

—— réactions démontrées chez *A. aceti*
- - - - réactions hypothétiques.
═══ réactions étudiées

La différence est beaucoup plus marquée sur les cellules entières lorsque la mesure est effectuée à pH = 7 au lieu de 5. On peut penser que l'éthanol déshydrogénase particulaire est facilement accessible aux changements de pH externes.

Depuis les travaux de GALZY et SLONIMSKY (1955), SCHIMPFESSEL (1968), nous savons que les levures ont leurs éthanol déshydrogénases soumises à la régula-

tion par le substrat carboné utilisé. Nous savons également que le glucose réprime particulièrement l'éthanol déshydrogénase oxydative, c'est-à-dire l'enzyme qui assure l'entrée de l'éthanol dans le métabolisme en l'oxydant en acétaldéhyde. De même, chez *A. aceti*, le milieu à base de glucose entraîne la plus forte répression pour les éthanol déshydrogénases solubles et insolubles qui ont des fonctions oxydatives. Toutefois, les deux enzymes ne sont pas réprimées avec la même intensité pour la dose de glucose étudiée. C'est l'alcool déshydrogénase particulaire qui est la plus réprimée : 94,7 p. 100 à pH = 5 au lieu de 43,3 p. 100 pour l'éthanol déshydrogénase couplée au NAD. Les effets observés pour le glucose se retrouvent pour l'acétate et le lactate.

Pour l'oxydation de l'acétaldéhyde, les mesures faites à pH = 6 sur les cellules entières montrent une diminution d'activité de 30 p. 100, 23 p. 100 et 58 p. 100 si le substrat carboné est l'acétate, le lactate ou le glucose-alanine à la place de l'éthanol ; sur les extraits enzymatiques insolubles, le QO_2 est diminué de 53 p. 100, 60,6 p. 100, 60,7 p. 100 à pH = 6, pour les mêmes substrats.

Le lactate et l'alanine utilisent l'acétaldéhyde déshydrogénase pour leur catabolisme (fig. 1) ; on peut donc supposer que le lactate et l'alanine entraînent la répression catabolique de l'aldéhyde déshydrogénase insoluble.

Pour les acétaldéhyde déshydrogénases solubles liées au NAD et au NADP, on constate que les activités d'oxydation sont diminuées pour les extraits obtenus avec comme substrat carboné l'acétate, le lactate et le glucose-alanine à la place de l'éthanol. Exception faite pour l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase liée au NADP obtenue avec le glucose-alanine, on observe en effet une augmentation d'activité de 35 p. 100.

C'est le lactate qui réprime le plus les acétaldéhyde déshydrogénases solubles ; ainsi l'activité liée au NAD est diminuée de 76,8 p. 100 et celle liée au NADP de 46,3 p. 100 par rapport aux activités obtenues sur éthanol. Pour ces mêmes enzymes l'acétate entraîne une diminution d'activité de 23,5 p. 100 et de 47,8 p. 100. Le glucose-alanine diminue l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase liée au NAD de 10 p. 100 seulement. Ces différences constatées dans la répression des deux acétaldéhyde déshydrogénases entraînent pour les substances ayant l'acétaldéhyde comme produit intermédiaire (éthanol, lactate, alanine) un rapport :

$$\frac{\text{Activité de l'aldéhyde déshydrogénase couplée au NADP}}{\text{Activité de l'aldéhyde déshydrogénase couplée au NAD}}$$

nettement supérieur à celui obtenu pour les extraits enzymatiques de cellules cultivées sur acétate (tabl. 5).

Nous savons que, généralement, le $NADPH_2$ est utilisé préférentiellement au $NADH_2$ pour les fonctions de synthèse (Kaplan, 1963), on a donc une réponse logique à l'augmentation du rapport considéré. Ce fait expliquerait le rôle de l'alanine, substance indispensable à la croissance sur glucose (Monard *et al.*, 1967) : l'alanine permettrait de fournir du $NADPH_2$ aux synthèses cellulaires.

Reçu pour publication en juin 1970.

SUMMARY

INFLUENCE OF CARBON SUBSTRATE ON THE OXYDATION OF ETHANOL AND ACETALDEHYDE BY *ACETOBACTER ACETI*

The oxidation of ethanol and acetaldehyde by *Acetobacter aceti* NCIB 8554 was mesured for exponentially grown cells on the minimal medium with various carbon sources : ethanol, acetate, lactate, glucose-alanine in concentration 0,08 M.

The ethanol-grown cells oxidized more the ethanol and the acetaldehyde than the cells grown in acetate, lactate or glucose-alanine.

On the cells extracts, it was found that the insoluble deshydrogenase is the more inductible enzyme ; the insoluble acetaldehyde deshydrogenase is inductible in a far less degree ; it is the same for the soluble ethanol deshydrogenase linked with NAD and the solubles acetaldehyde deshydrogenases linked respectively with NAD and NADP.

In the discussion is considered the function of the two solubles acetaldehyde deshydrogenases for the metabolism of utilized carbon sources.

RESUMEN

ACCION DEL CARBONO DEL SUBSTRATE SOBRE LA OXIDACION DEL ETANOL Y DEL ALDEHIDO ACÉTICO POR *ACETOBACTER ACETI*

Se ha medido la capacidad de oxidation del etanol y del aldehido acético de *Acetobacter aceti* NC IB 8554 tomado durante la fase exponencial del crecimiento en un medio de cultivo minimo, conteniendo diferentes fuentes de carbono : etanol, acetato, lactato y una mezcla de glucosa-alanina a la concentration de 0,08 M.

Las células cultivadas en etanol presentan una actividad de oxidacion del etanol y del aldedido acético mucho mas importante que las células cultivadas en acetato, lactato o glucose alanina.

En los extractos enzimaticos se ha constatado que la deshidrogenasa insoluble del etanol se vuelve ligeramente soluble, al igual que la deshidrogenasa soluble del etanol funcionando con el NAD y las deshidrogenasas solubles del aldehido acético funcionando respectivamente con el NAD y el NADP.

La discussion trata particularmente del rol de las dos deshidrogenasas solubles del aldehido con respecto al metabolismo del carbono del substrato segun la fuente utilizade.

RIASSUNTO

AZIONE DEL SOTTOSTRATO CARBONATO SULL'OSSIDAZIONE DELL'ETANOLO E DELL'ACETALDEIDE CON *ACETOBACTER ACETI*

Si è misurata l'attivatà d'ossidazione per l'etanolo e l'acetaldeide d'*A. aceti* NC IB 8554 prelevato nel corso della sua fase esponenziale di crescenza su un mezzo minimo con l'etanolo, l'acetato, il lattato e il miscuglio glucosio-alanina a concentrazione di 0,08 M come sottostrati carbonati.

Le cellule che si manifestano sull'etanolo presentano un'attività d'ossidazione per l'etanolo e l'acetaldeide più importante delle cellule ottenute a partire dall'acetato, dal lattato o dal glucosio-alanina.

Sugli estratti enzimatici, si è constatato che l'etanolo deidrogenasi insolubile, lo è a un grado minore, lo stesso vale per l'etanolo deidrogenasi solubile funzionante con il NAD e gli acetal deide deidrogenasi solubili funzionanti rispettivamente con il NAD e il NADP.

Nello studio, si prevede in particolare il ruolo delle due aldeidi deidrogenasi solubili in rapporto al metabolismo dei sottostrati carbona i impiegati.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ASAI T., 1968. *Acetic acid bacteria.* University Park Press, Baltimore.

ATKINSON D. E., 1956. The oxidation of ethanol and tricarboxylic acid cycle intermediates by *Acetobacter peroxydans*. *J. Bacteriol.*, **72**, 195-198.

DIVIES C., DUPUY P., 1969. Oxydation de l'acétate par *A. rancens*. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 339-350.

DIVIES C., DUPUY P., 1970. Mise en évidence d'acétaldéhyde libre au cours de l'oxydation de l'éthanol par les particules submicroscopiques d'*A. rancens*. *C. R. Acad. Sci.*, **270**, 1182-1184.

DUPUY P., MAUGENET J., 1962. Oxydation de l'éthanol par *A. rancens*. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 219-225.

GALZY P., SLONIMSKI P. P., 1955. Évolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, 2556-2558.

GREEN D. E., 1956. In *Proceeding of the third international Congress of Biochemistry*, Brussels, 1955. Academic Press, New York, 281.

KAPLAN N. O., 1963. I. Multiple forms of enzymes. *Bacteriol. Rev.*, **27**, 155-169.

KIDA M., ASAI T., 1968. In ASAI T. *Acetic acid bacteria.* University Park Press, Baltimore, 133-135.

DE LEY J., 1960. Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in *Pseudomonas* and related microorganisms. *J. appl. Microbiol.*, **23**, 400-441.

DE LEY J., SCHELL J., 1962. *J. gen. Microbiol.*, **29**, 589. Cité par ASAI (1968).

LUBOCHINSKY B., ZALTA J., 1954. Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **36**, 1363-1366.

MONARD D., HUTTER R., ETTLINGER L., 1967. Auxotrophie dictée par la source d'énergie chez *A. aceti*. *Pathol. Microbiol.*, **30**, 966-971.

NAKAYAMA T., 1960. Studies on acetic acid bacteria. II. Intracellular distribution of enzymes related to acetic acid fermentation and some properties of a highly purified TNP dependant aldehyde deshydrogenase. *J. Biochem.*, **46**, 812-830.

NAKAYAMA T., 1961. IV. Purification and properties of a new type of alcool deshydrogenase, alcool-cytochrome-553 reductase. *J. Biochem.*, **49**, 240-251.

PRIEUR P., 1957. Présence de deux systèmes d'oxydation de l'éthanol dans *A. xylinum*. *C. R. Acad. Sci.*, **244**, 253-255.

PRIEUR P., 1960. Présence de deux systèmes d'oxydation de l'acétaldéhyde en acide acétique dans *A. xylinum*. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 1733-1735.

RAO M. R. R., GUNSALUS J. C., 1955. *Feder. Proc.*, **14**, 267, citée par ASAI (1968).

SCHIMPFESSEL L., 1968. Présence et régulation de la synthèse de deux alcool déshydrogénases chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. biophys. Acta*, **151**, 317-329.

SCHULTZ J. S., GADEN F. L., 1956. Sulfite oxidation as a mesure of aeration effectiveness. *Industr. engng. Chem.*, **48**, 2209-2216.

STOUTHAMER A. H., 1960. *Koohlhydraatstofwisseling van de Azijnzurbacterien.* Thesis, Univ. Utrecht.

TANNENBAUM S., 1956. The metabolism of *A. peroxydans*. *Biochim. biophys. Acta*, **21**, 335-349.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (3), 197-204.

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE A L'ANALYSE DES EAUX-DE-VIE DE VIN

J. BRICOUT
avec la collaboration technique de Nadine AZOULAY

Institut de Recherches appliquées aux Boissons
87, rue de Paris, 93 - Montreuil

RÉSUMÉ

L'utilisation d'une colonne capillaire à haute efficacité améliore considérablement la finesse de l'analyse chromatographique des eaux-de-vie.

Grâce à une technique simple de déshydratation partielle par le sulfate de sodium anhydre, il est possible de mettre en évidence les principaux alcools et esters supérieurs. On a ainsi pu montrer que les eaux-de-vie d'Armagnac se distinguaient de celles de Cognac par une faible quantité de caprylate et caprate d'éthyle et par l'absence de laurate d'éthyle.

INTRODUCTION

Les analyses chimiques classiques des eaux-de-vie ne donnent que peu de renseignements sur leur composition, aussi utilise-t-on de plus en plus l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. Lors du second congrès d'œnologie, COUILLAUD (1967) a montré que deux méthodes analytiques sont essentiellement employées.

La première consiste à injecter directement l'eau-de-vie dans le chromatographe et à doser les constituants principaux : alcools supérieurs, acétate d'éthyle, méthanol. Cette méthode a été décrite par de nombreux auteurs, en particulier BRUNELLE (1967), SINGER et STILES (1965), DELUZARCHE *et al.* (1967), DRAWERT *et al.* (1967), JOURET et MOUTOUNET (1968).

La deuxième technique consiste à concentrer les constituants aromatiques volatils par extraction de l'eau-de-vie à l'aide de solvants organiques. On utilise principalement l'azéotrope éther-pentane préconisé par MECKE *et al.* (1960). BARAUD (1961) a ainsi étudié la composition de plusieurs Cognacs tandis que FLANZY et JOURET (1963) ont étudié plusieurs échantillons d'eaux-de-vie d'Armagnac.

Cependant les techniques d'extraction sont difficilement quantitatives ; elles ont

été étudiées en détail dans le cas du vin par BOIDRON (1966) qui recommande l'extraction en continu par le pentane pendant 240 heures.

Il semble que la grande difficulté de l'étude des constituants responsables du bouquet des eaux-de-vie provient du trop faible pouvoir de séparation des colonnes et du manque de sensibilité de la méthode. En outre, dans les colonnes garnies, on a un phénomène de décomposition de la phase stationnaire, lorsqu'on augmente la température, ce qui provoque une dérive importante de la ligne de base, supprimant ainsi les pics des constituants mineurs. Ces deux inconvénients peuvent être en grande partie atténués si l'on utilise une colonne capillaire du type Golay contenant une phase stationnaire résistante à la température. De telles colonnes peuvent avoir un pouvoir de résolution supérieur à 100 000 plateaux théoriques et elles ont déjà été utilisées avec succès dans l'analyse des huiles essentielles. Le débit optimum de gaz vecteur étant faible, on a peu de décomposition thermique de la phase stationnaire et il est possible d'utiliser le détecteur à ionisation de flamme à son maximum de sensibilité, même lors d'une programmation de température.

Nous avons étudié les perspectives offertes par ce type de colonne dans l'analyse des eaux-de-vie, sans recourir à une extraction par solvant organique. Afin de ne pas injecter trop d'eau qui pourrait détériorer la colonne, nous avons préalablement procédé à une déshydratation partielle de l'eau-de-vie par le sulfate de sodium anhydre.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Appareillage

Nous utilisons un chromatographe en phase gazeuse Girdel (Giravions-Dorand) équipé d'un programmateur de température et d'un injecteur-diviseur chauffé et réglable. La colonne en acier inox a une longueur de 100 mètres pour un diamètre interne de 0,5 mm et nous déposons sur ses parois un film mince de Carbowax 20 M. Les connexions entre la colonne, l'injecteur et le détecteur sont réalisées avec le minimum de volume mort. Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

— température de l'injecteur et du détecteur : 180-170°C ;
— température du four : 55°5C pendant 25 minutes puis programmation à 3°C/minute jusqu'à 220°C.
— débit total d'azote : 55 ml/minute ;
— débit d'azote dans la colonne : 2,2 ml/minute ;
— débit d'hydrogène : 20 ml/minute ;
— débit d'air : 400 ml/minute ;
— injection : 10 µl dont seulement 4 p. 100 sont introduits effectivement dans la colonne ;
— vitesse d'enregistrement : 50 cm/heure.

Dans ces conditions, le nombre de plateaux théoriques, calculé pour le *n*-butanol, est de l'ordre de : 90 000.

Préparation de l'échantillon

— Vingt ml d'eau-de-vie à 40° GL sont mis en contact avec 50 g de sulfate de sodium anhydre pendant 16 heures à 0°C. Le gâteau résultant est concassé et on en exprime quelques millilitres de liquide par pressage modéré sous un vide d'environ 20 torrs.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 représente le chromatogramme d'une eau-de-vie d'Armagnac et la figure 2 celui d'une eau-de-vie de Cognac « Fine Champagne ». Notons que, malgré la programmation de température, la dérive de la ligne de base est faible.

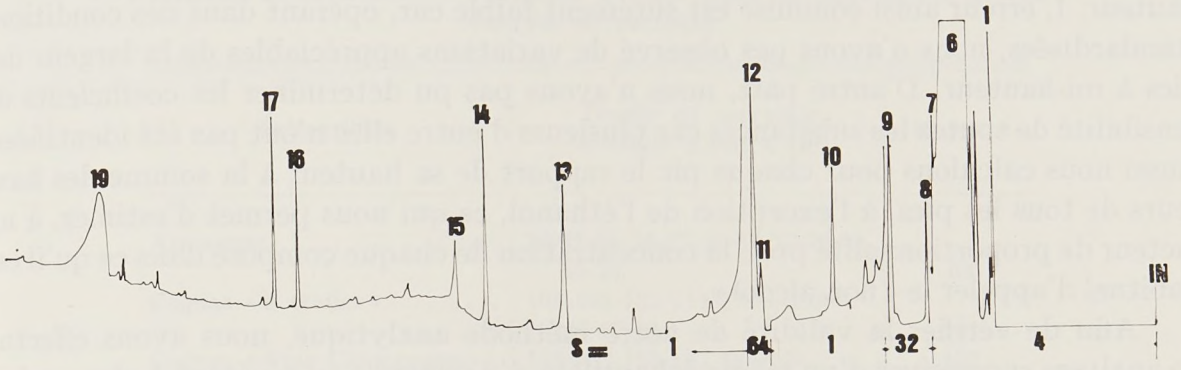


FIG. 1. — *Chromatogramme d'une eau de vie d'Armagnac*
Les sensibilités (*s*) de chaque pic sont indiquées sous la ligne de base

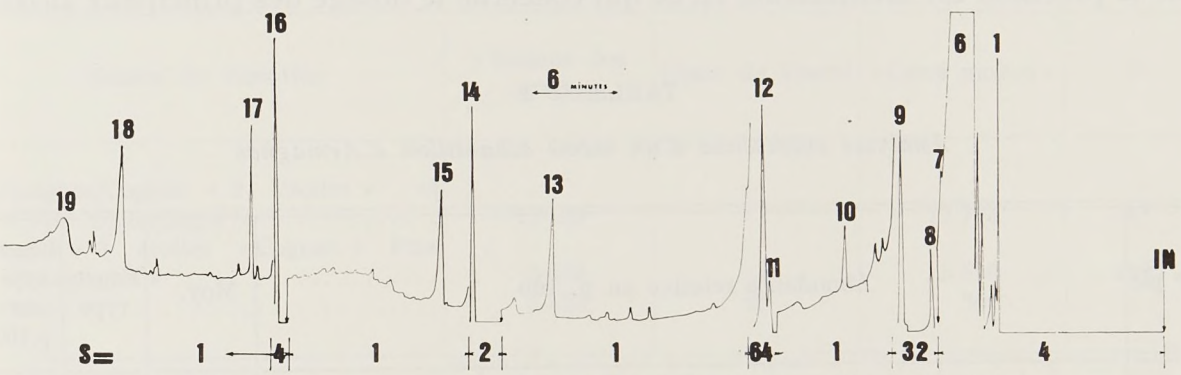


FIG. 2. — *Chromatogramme d'une eau de vie de Cognac « Fine Champagne »*

Substance	N° du pic
n-propanol-1	8
Méthyl-2-propanol-1	9
n-butanol-1	10
Méthyl-2-butanol-1	11
Méthyl-3-butanol-1	12
n-hexanol-1	13
Caprylate d'éthyle	14
Caprate d'éthyle	16
Laurate d'éthyle	18
Phényl 2-Éthanol-1	19

Nous n'avons pas dans ce travail cherché à identifier tous les constituants, mais, nous basant sur les travaux antérieurs, nous avons localisé sur notre chromatogramme

les principaux alcools et esters supérieurs. La colonne est surchargée par l'éthanol (pic 6), et le phényl-2-éthanol (pic 19) est mal élué.

On note la présence d'une cinquantaine de pics dont 19 ont une intensité suffisante pour permettre des mesures quantitatives.

La concentration d'un composé dans un mélange est proportionnelle au rapport qui existe entre la surface délimitée par le pic de ce corps et la surface de tous les pics décelés. Or, sur nos chromatogrammes plusieurs pics sont trop fins pour permettre des mesures de surface, aussi nous devons nous contenter de la détermination de leur hauteur. L'erreur ainsi commise est sûrement faible car, opérant dans des conditions standardisées, nous n'avons pas observé de variations appréciables de la largeur des pics à mi-hauteur. D'autre part, nous n'avons pas pu déterminer les coefficients de sensibilité de toutes les substances car plusieurs d'entre elles n'ont pas été identifiées. Aussi nous calculons pour chaque pic le rapport de sa hauteur à la somme des hauteurs de tous les pics, à l'exception de l'éthanol, ce qui nous permet d'estimer, à un facteur de proportionnalité près, la concentration de chaque composé dans ce qu'il est habituel d'appeler le « non alcool ».

Afin de vérifier la validité de notre méthode analytique, nous avons effectué 10 analyses successives d'un même échantillon d'Armagnac en répétant à chaque fois l'étape de déshydratation partielle par le sulfate de sodium anhydre dans des conditions standardisées. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 1. On voit que la précision est satisfaisante en ce qui concerne le dosage des principaux alcools

TABLEAU I

Analyses successives d'un même échantillon d'Armagnac

N° pic	Abondance relative en p. 100										Moy.	Écart-type	Écart-type en p.100
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1	3,4	3,8	3,7	3,6	1,8	3,6	3,6	5,2	4,2	1,4	3,7	0,8	22
2	0,8	0,9	0,8	1,2	1,0	1,3	1,4	0,9	1,1	1,6	1,1	0,3	27
3	0,39	0,48	0,40	0,45	0,45	0,42	0,43	0,52	0,45	0,46	0,45	0,04	9
4	2,5	3,1	2,1	6,0	4,2	7,0	5,8	2,3	2,6	2,6	3,8	1,8	47
5	2,4	2,3	2,2	3,1	2,5	3,4	3,2	2,8	2,6	2,5	2,7	0,4	16
6	Éthanol												
7	0,61	0,63	0,62	0,65	0,70	0,70	0,60	0,54	0,48	0,64	0,62	0,07	11
8	11,6	11,5	10,8	11,7	11,8	12,0	11,9	10,1	10,4	11,7	11,3	0,7	6
9	17,9	18,2	17,7	18,6	18,7	18,7	18,9	17,3	18,1	20,0	18,4	0,75	4
10	0,40	0,38	0,40	0,33	0,37	0,33	0,33	0,38	0,39	0,38	0,37	0,03	8
11	12,4	12,3	12,4	11,4	12,0	10,4	10,8	11,5	12,0	11,2	11,6	0,7	6
12	44,80	43,80	45,80	40,60	44,10	39,60	40,70	40,6	45,0	43,0	43,3	0,24	6
13	0,43	0,38	0,41	0,24	0,30	0,25	0,26	0,46	0,35	0,28	0,34	0,08	27
14	0,56	0,56	0,58	0,52	0,57	0,48	0,50	0,51	0,55	0,57	0,54	0,04	7
15	0,19	0,17	0,17	0,13	0,15	0,12	0,14	0,12	0,18	0,4	0,15	0,03	20
16	0,39	0,37	0,44	0,20	0,35	0,28	0,30	0,42	0,36	0,34	0,35	0,07	20
17	0,55	0,50	0,63	0,32	0,39	0,31	0,34	0,76	0,52	0,34	0,47	0,15	32
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	0,24	0,21	0,26	0,14	0,12	0,09	0,21	0,32	0,14	0,07	0,18	0,08	44

supérieurs (6 p. 100). Pour les autres composés, la précision est beaucoup moins bonne (20-30 p. 100). En fait, ceci n'est pas étonnant si l'on songe à leur concentration absolue qui, dans le cas du caprylate d'éthyle, peut être estimée inférieure à 10 p.p.m. dans une eau-de-vie à 40°GL. En outre, nous avons observé au cours du pressage sous vide des pertes sensibles parmi les constituants précédant l'éthanol sur notre chromatogramme.

TABLEAU 2

Variation de la teneur en caprylate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin
Analyse de variance

Échantillon	Teneur en caprylate d'éthyle p.100 x 10^2	Moyenne
Armagnac	76-81-54-56-27-36-87-72-73-92-50-50	63
Cognac « 3 étoiles »	104-108-122-111-77-86-118-117-87-81	101
Cognac « Fine Champagne » .	146-137-125-137-125-124	132

ANALYSE DE VARIANCE

Source de variation	« Somme des carrés »	Degré de liberté	« Carré moyen »	F
Armagnac/Cognac « 3 étoiles » et « Fine Champagne »	17 128	1	17 128	56*
Cognac « 3 étoiles »/Cognac « Fine Champagne »	3 658	1	3 658	12*
Erreur	7 533	25	301	

* $F_{0,01}$ pour 1 et 25 DL = 7,7.

Il apparaît que les chromatogrammes de Cognac et d'Armagnac sont très différents en ce qui concerne les esters éthyliques : on note en effet l'absence de laurate d'éthyle dans l'Armagnac, ce qu'avaient déjà mentionné Flanzy et Jouret (1963) qui pensent que ceci est dû au mode de distillation, et une plus grande quantité de caprylate et de caprate d'éthyle dans le Cognac.

Nous avons cherché à vérifier ce résultat en analysant plusieurs eaux-de-vie commerciales d'Armagnac et de Cognac (3 étoiles et Fine Champagne). Nous avons confirmé l'absence de laurate d'éthyle dans tous les échantillons d'Armagnac. En outre, nous avons calculé pour chacun des échantillons les teneurs en caprylate et caprate d'éthyle. Ces résultats ont été alors soumis à une analyse de variance avec comparaisons orthogonales selon Lison (1958) (tabl. 2 et 3). Nous effectuons pour chacun de ces deux esters le calcul de F pour deux comparaisons : l'Armagnac par rapport à l'ensemble des Cognacs et la Fine Champagne par rapport au Cognac 3 étoiles. La valeur de F nous permet alors d'exprimer le degré de validité des diffé-

rences observées. Il apparaît que les teneurs en ces deux esters sont plus faibles d'une façon hautement significative (probabilité supérieure à 99 p. 100) dans le cas de l'Armagnac. Il semble qu'on puisse même distinguer la « Fine Champagne » du Cognac « 3 étoiles » par sa teneur plus élevée en caprylate d'éthyle.

Ce dernier point doit cependant être vérifié mais il est en accord avec l'observation de BARAUD (1961) faite lors d'une comparaison des eaux-de-vie de Cognac « Fin Bois » et « Grande Champagne ».

TABLEAU 3

Variation de la teneur en caprate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin
Analyse de variance

Échantillon	Teneur en caprate d'éthyle p. 100 x 10^2	Moyenne
Armagnac	26-28-28-33-27-21-11-13-10-10-11-16	19
Cognac « Fine Champagne » .	240-261-236-193-296-70	216
Cognac « 3 étoiles »	119-233-235-207-165-168-120-95	167

ANALYSE DE VARIANCE

Source de variation	« Somme des carrés »	Degré de liberté	« Carré moyen »	F
Armagnac/Cognac « 3 étoiles » et « Fine Champagne »	184 392	1	184 392	81*
Cognac « 3 étoiles »/Cognac « Fine Champagne »	7 982	1	7 982	3,1*
Erreur	52 331	23	2 275	

* $F_{0,05}$ pour 1 et 23 DL = 4,28 ; $F_{0,01}$ pour 1 et 23 DL = 7,88.

CONCLUSION

L'utilisation d'un chromatographe en phase gazeuse, équipé d'une colonne capillaire de très haute efficacité, améliore considérablement la finesse et la précision de l'analyse chromatographique des eaux-de-vie. Une telle technique devrait permettre une meilleure caractérisation analytique des différents crus, et l'établissement de corrélations plus sûres entre les qualités organoleptiques d'une eau-de-vie et son chromatogramme.

Reçu pour publication en juin 1970.

SUMMARY

APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY ON CAPILLARY COLUMN TO THE ANALYSIS OF BRANDY.

The use of open tubular columns in the gas-chromatographic analysis of brandy improves the accuracy and sensitivity of the method. By direct injection of the previously dehydrated spirit, an estimation of the concentration of the higher alcohols and esters is possible. The concentration of ethyl caprylate, caprate and laurate was shown to be the major difference between brandies of Cognac and Armagnac.

RESUMEN

APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA SOBRE COLUMNA CAPILAR AL ANALISIS DE LOS AGUARDIENTES DE VINO

La utilizacion de una columna capilar altamente eficaz mejora considerablemente la fineza del análisis cromatográfico de los aguardientes de vino.

Gracias a una tecnica simple de deshidratacion parcial con sulfato de sodio anhidro, es posible separar los principales alcoholes y ésteres superiores. De manera se ha podido mostrar que los aguardientes de Armagnac difieren de los de Cognac por una pequeña cantidad de caprylato y caprato de etilo y por la ausencia de laurato de etilo.

RIASSUNTO

APPLICAZIONE DELLA CROMATOGRAFIA IN FASE GASSOSA SU TUBO CAPILLARE ALL'ANALISI DELL'ACQUAVITE DI VINO

L'impiego di un tubo capillare altamente efficace migliora considerevolmente la finezza dell'analisi cromatografica dell'acquavite.

Grazie a una tecnica semplice di disidratazione parziale con solfato di sodio anidro, è possibile mettere in evidenza i principali alcool ed esteri superiori. Si è potuto in tal modo dimostrare che l'acquavite di Armagnac si distingueva dall'acquavite di Cognac per un debole grado di caprilato e caprato d'etile e per l'assenza di laurato d'etile.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARAUD J., 1961. Étude quantitative, par chromatographie en phase vapeur, des alcools et esters de la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. chim. Fr.*, 1874-1877.

BOIDRON J. N., 1966. *Essai d'identification des constituants de l'arôme des vins de* Vitis vinifera L. *Premiers résultats*. Thèse, Bordeaux.

BRUNELLE R., 1967. Evaluation of gas liquid chromatography for the quantitative determination of fused oil in distilled spirits. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **50** (2), 322-329.

COUILLAUD P., 1967. Nouvelles techniques d'analyse appliquées à l'étude des eaux de vie de Cognac ; in *Fermentations et Vinifications*, 2e Symposium international d'Œnologie, Bordeaux-Cognac, 631-645.

Deluzarche A., Maillard A., Maire J.-C., Sommer J. M., Wagner M., 1967. Analyse de quelques eaux de vie par chromatographie en phase vapeur. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, (676), 173-181.

Drawert F., Heimann W., Tsantalis G., 1967. Gaschromatographischer Vergleich verschiedener Branntweine. *Z. anal. Chem.*, **228**, 170-180.

Flanzy M. Jouret C., 1963. Contribution à l'étude des eaux de vie d'Armagnac par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Technol. agric.*, **12** (1), 39-50.

Jouret C., Moutounet M., 1968. Comparaison des alcools supérieurs des eaux de vie d'Armagnac et des whiskies. *Ann. Technol. agric.*, **17** (2), 151-158.

Lison L., 1958. *Statistique appliquée à la biologie expérimentale.* Gauthier-Villars, éd. Paris.

Mecke R., Schindler R., de Vries M., 1960. *Wein-wissenschaft*, **15**, 183-191.

Singer D. D., Stiles J. W., 1965. The determination of higher alcohols in potable spirits : comparison of colorimetric and gas-chromatographic methods. *Analyst.*, **90**, 290-296.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (3), 205-216.

APPAREIL POUR LA MESURE AUTOMATIQUE ET L'ÉTUDE CINÉTIQUE DES ÉCHANGES D'UN GAZ A PRESSION ET TEMPÉRATURE CONSTANTES

Y. CHAMBROY, P. FERRY et C. FLANZY
avec la collaboration technique de Françoise PASCAL et M. BONFILS

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, 84 - Montfavet
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Dans le but de mesurer les échanges, à température définie et constante, de gaz carbonique entre des échantillons de 100 baies de raisin et l'atmosphère fortement enrichie en CO_2 (95-98 p.100) d'une enceinte expérimentale, les auteurs ont été conduits à mettre au point un appareil automatique à pression constante, à montage différentiel, enregistrant la cinétique de l'absorption et du dégagement de ce gaz.

La différence de pression entre l'enceinte de mesure et la cellule de référence provoque l'addition ou la soustraction d'un volume prédéterminé de gaz à l'atmosphère de la chambre de mesure. Cette opération est assurée par le pompage d'un liquide intermédiaire. L'enregistrement se ramène à un comptage du nombre de volumes gazeux mis en œuvre.

L'appareil peut servir à des mesures de longue durée ainsi qu'à des mesures de respiration.

I. — INTRODUCTION

Au cours d'essais de laboratoire sur la fermentation intracellulaire de baies de raisin placées en atmosphère de gaz carbonique, nous observons qu'une dépression est créée dans l'enceinte expérimentale ; après un temps, variable avec la température de l'essai, une surpression apparaît (FLANZY *et al.*, 1967). Cette évolution de la pression de l'atmosphère traduit successivement une absorption de CO_2 par les baies puis le dégagement de gaz carbonique dû à la fermentation intracellulaire.

Nous cherchons à mesurer l'amplitude de ces deux phénomènes et à suivre leur cinétique.

Le fait de conduire toute l'expérience en atmosphère de gaz carbonique ne permet pas d'utiliser certaines méthodes proposées pour le dosage de ce gaz (MAFFLY, 1968 ; PITA, 1969 ; REES, 1969 ; LOUWERSE et Van OORSCHOT, 1969).

Des techniques de mesure débitmétrique existent (SOUDAIN, 1965 ; MARCELLIN, 1966 ; MARCELLIN, SOUDAIN et PHAN PHUC, 1967). Cependant il nous a paru préférable de retenir, pour notre travail, le principe de mesures volumétriques.

Les essais préliminaires effectués sur 6 à 8 baies dans des cellules de 100 ml, à l'appareil de Warburg, nous ont conduit à étudier les problèmes d'échantillonnage. Le nombre minimal de baies par lot, nécessaire pour obtenir une reproductibilité satisfaisante des mesures, a été fixé, expérimentalement, à 100. De tels lots, relativement volumineux, ont nécessité la mise au point d'appareils de type Warburg de grande capacité.

Cette dernière technique, bien qu'ayant donné des résultats intéressants (CHAMBROY, FLANZY et ANDRÉ, 1967) est sujette à critiques, tout particulièrement sur deux points :

d'une part, la pression du CO_2 dans l'enceinte est variable tout au long de l'essai. Or, il nous paraît souhaitable d'éviter des dissolutions ou des désorptions de CO_2 dues à des variations de pression du milieux gazeux où sont plongées les baies ;

d'autre part, l'échantillon étant volumineux, l'augmentation de pression devient rapidement trop importante pour permettre une mesure correcte au cours d'essais de longue durée (plus de 5 heures).

C'est pourquoi nous avons cherché à réaliser les mesures sous pression constante.

La mise au point d'un appareillage dérivé du respiromètre de Gilson (UMBREIT, BURRIS et STAUFFER, 1964) et son automatisation, en vue d'essais de longue durée, font l'objet de ce mémoire. Les résultats obtenus par ce système seront publiés ultérieurement.

II. — PRINCIPE

Le dispositif expérimental est un système clos, à température constante, dans lequel la pression de l'enceinte de mesure est constamment comparée à une pression de référence.

Un déséquilibre de pression, d'une valeur prédéterminée et constante, est détecté par le manomètre qui relie la cellule de mesure à celle de référence.

Un volume prédéterminé et constant de gaz est alors mis en œuvre au moyen d'un piston liquide, pour ramener dans la cellule de mesure la pression à la valeur initiale de référence (addition ou soustraction de gaz selon le sens de variation).

Le nombre de volumes gazeux élémentaires ainsi mis en œuvre est enregistré en fonction du temps ; ces volumes élémentaires sont les volumes réels (à la température et à la pression considérées) de gaz échangés entre le matériel étudié et l'enceinte expérimentale.

III. — DESCRIPTION DE L'APPAREIL

1. *Enceintes réactionnelles*

L'appareil, exécuté en verre Pyrex, est représenté par la figure 1.

Les enceintes de mesure A et de référence D sont des ballons de 1 litre à 2 tubulures (1 RIN 34/35 et 1 RIN 19/26), munis chacun d'un tube plongeant au fond du ballon.

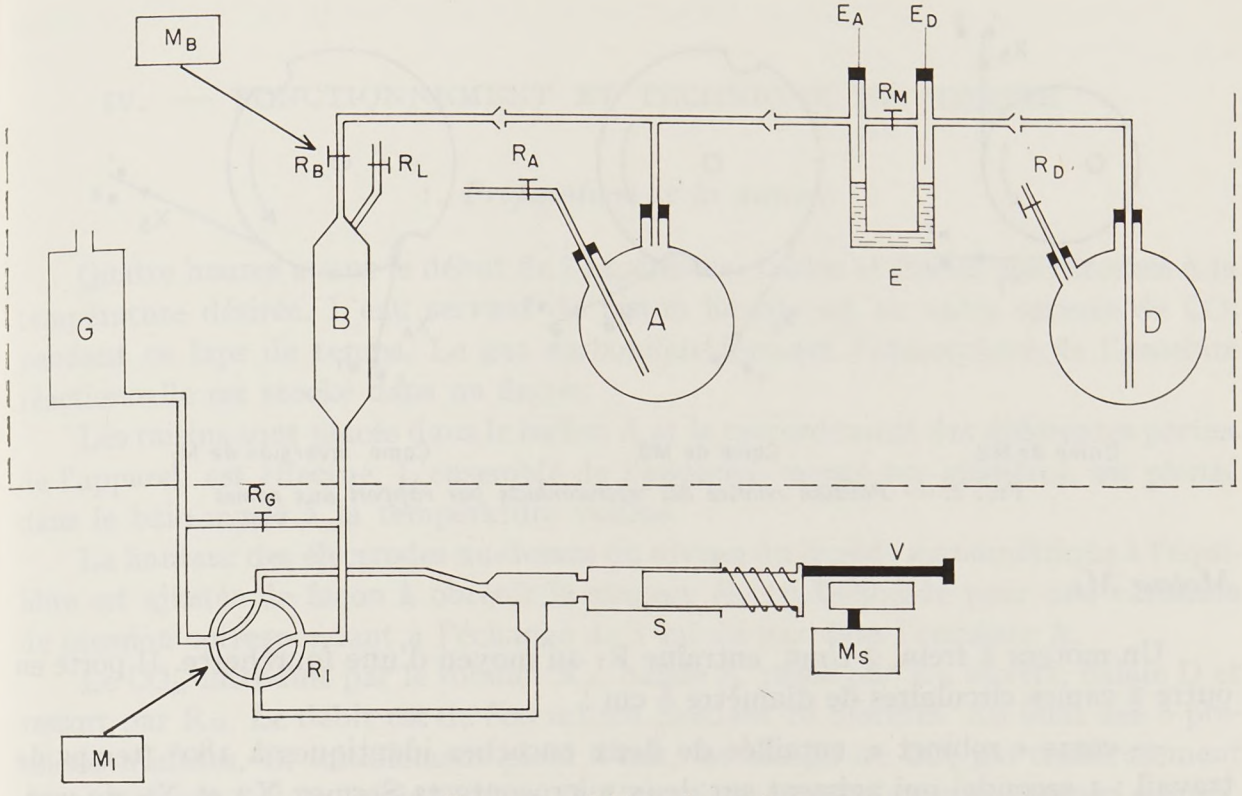


FIG. 1. — *Schéma de montage*

Un manomètre à eau relie entre eux ces deux ballons. Il est constitué par un tube en U de diamètre intérieur 6 mm. Une électrode métallique E est soudée à sa partie inférieure ; chaque branche porte une électrode axiale ajustable en profondeur, E_A et E_D. Le liquide manométrique est de l'eau distillée additionnée à 3 p. 1 000 de NaCl et saturée de CO_2. Un robinet à boisseau R_M situé entre les branches du manomètre permet de relier directement A et D.

Une ampoule cylindrique B d'environ 500 ml, en position verticale, est reliée à A par l'intermédiaire d'un robinet à boisseau R_B, voie de 6 mm, accouplé à un moteur M_B.

Les connexions entre les quatre éléments qui viennent d'être décrits sont assurées par des rodages coniques ou des Rotulex 13/5.

L'ensemble, sauf M_B, est immergé dans un bain-marie d'eau de 60 litres dont la température est contrôlée à $\pm$ 0,°3 C.

Une seringue S de 5 ml, munie d'un Té à clapets pour le pompage et le refoulement unidirectionnel d'un liquide, est accouplée à un moteur M_S. Elle est reliée, d'une part à la base de B, d'autre part à un réservoir G, par l'intermédiaire d'un robinet plat R_I à 4 voies, accouplé à un moteur M_I. Les connexions du robinet R_I sont réalisées de façon telle que la seringue puisse transférer le liquide formant piston (en B) soit de G en B soit de B en G.

Les liaisons entre G, S, R_I et B sont réalisées par des tubes de caoutchouc 6-10 mm aussi courts que possible de façon à limiter la diffusion du CO_2 dans le milieu ambiant.

2. *Electromécanique*

Le dispositif électromécanique est détaillé dans la figure 2.

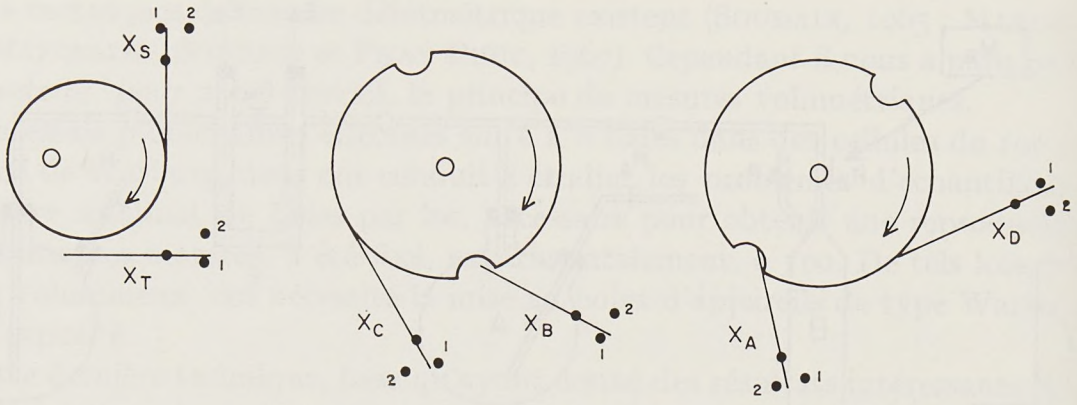


FIG. 2. — *Position relative des microcontacts par rapport aux cames*

Moteur M_I.

Un moteur à frein, 2 t/mn, entraîne R_I au moyen d'une fourchette. Il porte en outre 2 cames circulaires de diamètre 8 cm :

— came « robinet », entaillée de deux encoches identiques à 180° (temps de travail : 1 seconde) qui agissent sur deux microcontacts Sermec X_A et X_D de positionnement du robinet ;

— came « enregistrement », entaillée de 4 encoches à 90° (temps de travail : 1 seconde) agissant sur trois microcontacts pour l'enregistrement du fonctionnement de ce moteur M_I. Cette came se justifie seulement par notre système d'enregistrement.

Moteur M_B.

L'axe d'un moteur à frein, 2 t/mn, pénètre dans le bain-marie par un passage étanche et se termine par une fourchette qui entraîne R_B. Cet axe porte une came circulaire de diamètre 8 cm entaillée de deux encoches à 180° (temps de travail : 1 seconde) agissant sur deux microcontacts :

l'un X_B pour l'autoalimentation de M_B ;

l'autre X_C pour le démarrage du moteur M_S.

Moteur M_S.

Un moteur à frein, 12 t/mn, porte une came circulaire de diamètre 3,5 cm, excentrée de 8 mm, ayant pour rôle :

d'agir sur le microcontact X_S d'auto-alimentation et de positionnement de M_S ;

d'agir sur le microcontact X_T pour le comptage des volumes gazeux élémentaires mis en œuvre ;

d'enfoncer le piston dans le corps de la seringue.

Le mouvement inverse du piston est assuré par un ressort. La course de rappel du piston est ajustable au moyen d'une butée réglable V.

IV. — FONCTIONNEMENT ET TECHNIQUE DE MESURE

1. *Préparation de la mesure*

Quatre heures avant le début de l'expérience, raisins et fluides sont stockés à la température désirée. L'eau servant de piston liquide est en outre saturée de CO_2 pendant ce laps de temps. Le gaz carbonique formant l'atmosphère de l'enceinte réactionnelle est stocké dans un flacon.

Les raisins sont placés dans le ballon A et le raccordement des différentes parties de l'appareil est effectué. L'ensemble de l'appareil, monté sur glissières, est plongé dans le bain-marie à la température voulue.

La hauteur des électrodes au-dessus du niveau du liquide manométrique à l'équilibre est ajustée de façon à obtenir le contact électrode-liquide pour une variation de pression correspondant à l'échange de 1 ml du gaz dans l'enceinte A.

Le CO_2, introduit par le robinet R_A, balaie A, passe par R_M ouvert, balaie D et ressort par R_D. Le débit est de 800 ml/mn pendant 10 minutes. Au bout des 8 premières minutes, B, initialement plein d'eau, est rempli de CO_2 par transvasement direct (robinet R_G) du liquide B dans G. Une minute après l'arrêt du courant gazeux, les robinets R_A/R_D, R_M et R_B sont fermés ; la minuterie est enclenchée.

Pendant la phase d'absorption, la saturation en CO_2 de l'eau du réservoir G est assurée par barbotage permanent de gaz carbonique.

2. *Déroulement de la mesure*

Principe.

Le maintien de la pression initiale dans les enceintes implique le repérage du sens de l'échange gazeux et la remise à l'équilibre des pressions.

Le repérage est réalisé par les électrodes E_A et E_D. Lors d'un contact du liquide manométrique avec l'une de ces deux électrodes, le robinet R_I va être positionné, s'il ne l'est déjà, de manière à ce que la seringue transfère un volume unitaire de liquide dans le sens rétablissant l'équilibre des pressions.

La remise à l'équilibre des pressions intervient de la façon suivante : le moteur M_B fait faire un demi-tour au robinet R_B et pendant le temps d'ouverture de ce robinet le moteur M_S actionne la seringue qui délivre le volume unitaire ramenant l'équilibre du manomètre.

Description du fonctionnement.

Prenons pour exemple le cas d'un contact : liquide manométrique-électrode E_A (contact E/E_A). Le circuit électrique 24 V se ferme sur le relais T_A dont le contact K_A passe en 2 (fig. 3).

Positionnement du robinet R_I.

Deux cas peuvent alors se présenter quant à la position de R_I.

a) X_A est en 2 : cette situation du contact X_A correspond, par construction, à un bon positionnement de R_I. Le processus de remise à l'équilibre peut intervenir.

b) X_A est en 1 : M_I démarre. Il fait tourner R_I d'un quart de tour et la cam « robinet » bascule X_A en 2.

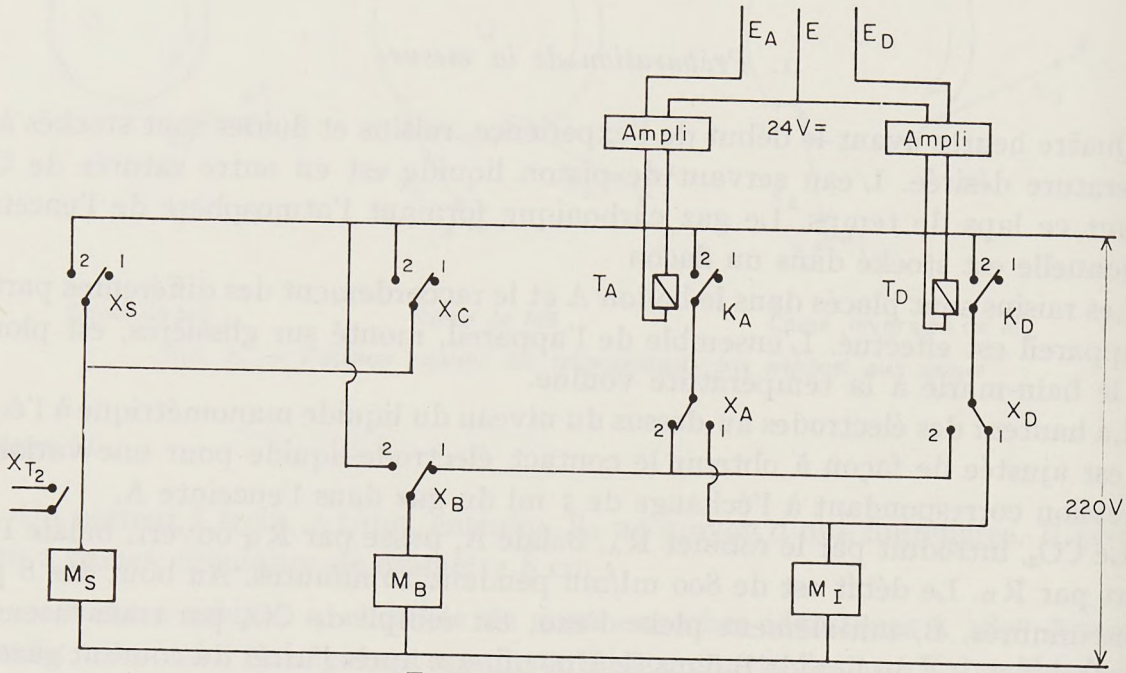


FIG. 3. — *Circuit électrique*

M : moteur X : microcontact
T : relais à contact K : repos travail

Remise à l'équilibre.

X_A est en 2, X_D étant en 1 par construction, le moteur M_B démarre. Sa came fait basculer X_B en 2 (auto-alimentation).

Juste avant l'ouverture de R_B, la came de M_B fait passer X_C en 2 provoquant le démarrage de M_S puis remet X_C en 1.

Au démarrage de M_S, X_S passe en 2 (autoalimentation). La rotation de la came de M_S agit sur le piston de la seringue et sur le contact X_T (enregistrement). Après un tour complet, cette came refait passer X_S en 1. M_S s'arrête alors.

Le demi-tour du robinet R_B étant fait, la seconde encoche de la came de M_B fait passer X_B en 1. M_B s'arrête alors, car l'action de la seringue a remis le manomètre à l'équilibre, le contact E/E_A s'est ouvert, K_A est revenu en 1.

Remarques

Un processus similaire intervient lors d'un contact E/E_D.

Les vitesses des moteurs ont été choisies en fonction de l'intensité des échanges gazeux des échantillons étudiés.

Les microcontacts travaillent par retombée dans les encoches des cames. Cette technique permet de mieux définir les instants de déclenchement.

Lorsque X_A est en 2, X_D est en 1 et réciproquement, sauf pendant la rotation de M_I, où X_A et X_D sont en 1.

La position des différents composants à un instant donné est représentée sur la figure 4.

Le moteur M_I n'intervient que lors de l'inversion de sens des échanges gazeux.

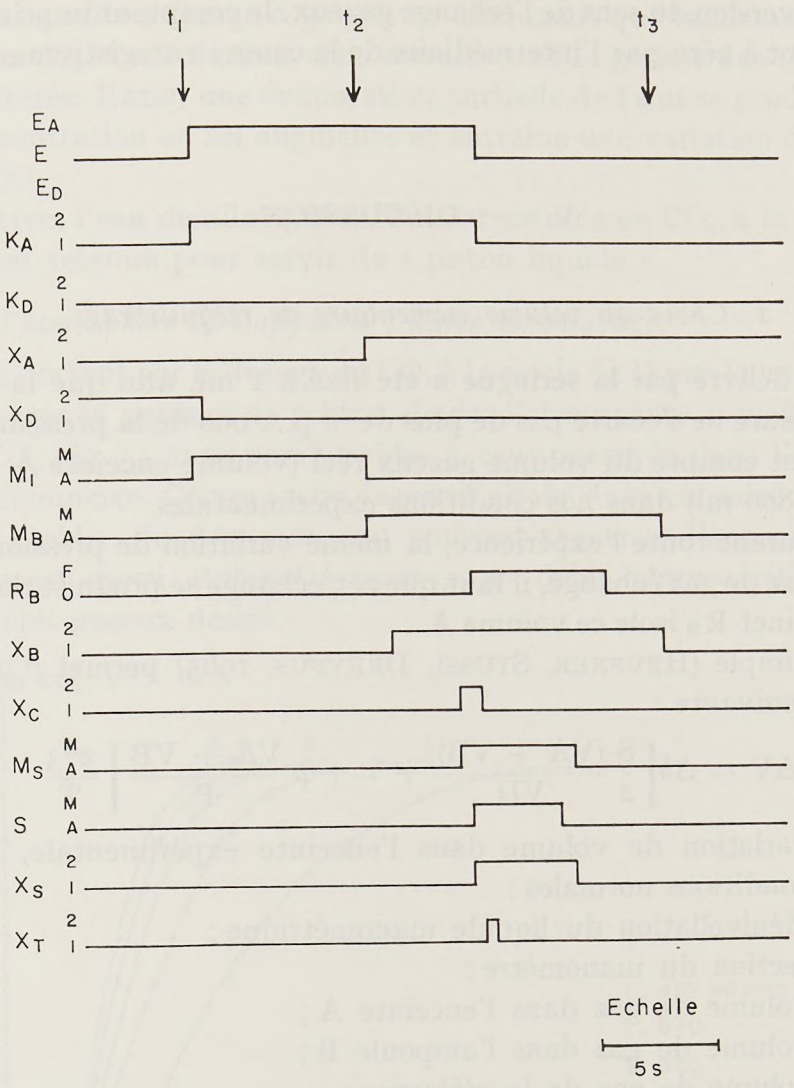


FIG. 4. — *Diagramme de fonctionnement*
$t_1 \cdot t_2$: séquence de positionnement de R_1
$t_2 \cdot t_3$: séquence de rééquilibrage des pressions

Cas d'expériences de longue durée.

A la suite de dégagements importants de CO_2, il arrive que l'ampoule B soit remplie de gaz. L'expérience peut cependant continuer. Il suffit pour cela, R_B restant fermé, de remplir entièrement B avec de l'eau saturée de gaz carbonique (tout en chassant le CO_2 à l'extérieur par le robinet R_L).

3. *Enregistrement des résultats*

La mesure du volume transféré revient à un comptage du nombre de manœuvres de la seringue. A cette fin, la came de M_S actionne, à chacun de ses tours, donc à chaque unité de volume gazeux échangé, le microcontact X_T qui délivre un signal électrique ; nous avons choisi d'enregistrer ce signal sur un compteur imprimant.

Une minuterie, constituée par un moteur synchrone 1 tour/mn et un compteur à présélection à remise à zéro automatique, envoie à intervalle de temps régulier un signal d'impression au compteur imprimant.

Lors de l'inversion du sens de l'échange gazeux, le compteur imprimant est rem automatiquement à zéro par l'intermédiaire de la came « enregistrement » du mote M_I.

V. — DISCUSSION

1. *Choix du volume élémentaire de rééquilibrage*

Le volume délivré par la seringue a été fixé à 1 ml, afin que la pression dan l'enceinte de mesure ne s'écarte pas de plus de 2 p. 1 000 de la pression de référenc Cette valeur tient compte du volume gazeux réel (volume enceinte A — volume d l'échantillon $\simeq$ 800 ml) dans nos conditions expérimentales.

Afin que, durant toute l'expérience, la même variation de pression correspond à une même masse de gaz échangé, il faut que cet échange se produise dans un volum constant. Le robinet R_B isole ce volume A.

Un calcul simple (Heusner, Stussi, Dreyfus, 1965) permet d'obtenir la for mule simplifiée suivante :

$$\Delta V = \Delta h \left[\frac{S}{2} \frac{(VA + VB)}{VD} + 1 + \rho \frac{VA + VB}{P} \right] \frac{273}{T}$$

avec : ΔV = variation de volume dans l'enceinte expérimentale, ramenée aux conditions normales ;
Δh = dénivellation du liquide manométrique ;
S = section du manomètre ;
VA = volume de gaz dans l'enceinte A ;
VB = volume de gaz dans l'ampoule B ;
VD = volume de gaz de la référence ;
ρ = poids spécifique du liquide manométrique ;
P = 760 mm Hg $\#$ 10 000 mm H_2O ;
T = température absolue du gaz.

Donc pour avoir $\frac{\Delta V}{\Delta h}$ constant à la détection, il est nécessaire d'isoler le volume variable VB, d'où la nécessité de R_B.

2. *Fluides*

Étant donné que le CO_2 est très soluble dans les liquides, le « piston liquide » de B, servant à compenser les variations de volume gazeux, doit être tel qu'il n'intervienne pas sur l'atmosphère expérimentale.

D'autre part, la saturation des enceintes en CO_2 doit être effectuée le plus rapidement possible pour réduire au maximum les quantités initiales de CO_2 absorbées par les raisins avant la mise en route de la mesure.

Choix de la nature du « piston liquide ».

Le mercure a été abandonné car il est d'un emploi malaisé dès que l'on en manipule des quantités relativement importantes.

Les solutions salines (jusqu'à 50 g/l) ne diminuent que faiblement le coefficient de solubilité du CO_2. Ces solutions sont corrosives et la graisse des robinets pourrait s'en trouver altérée. Enfin, une évaporation partielle de l'eau se produit au cours du temps ; le concentration en sel augmente et entraîne une variation du coefficient de solubilité du CO_2.

En définitive, l'eau distillée préalablement saturée en CO_2, à la température de l'expérience, est retenue pour servir de « piston liquide ».

Saturation de l'atmosphère de l'appareil : durée de balayage.

Des essais portant sur le dosage du CO_2 à la sortie de D par la méthode d'ORSAT montrent qu'après le passage de 7 litres de gaz l'atmosphère recueillie contient 95 à 98 p. 100 de CO_2 (fig. 5), taux comparables à ceux mesurés dans l'atmosphère des bouteilles du commerce. Compte tenu de ces résultats, de la nécessité d'une saturation relativement rapide, du flux maximal pouvant traverser l'appareil, un débit de 800 ml/minute est choisi. Robinet à pointeau et débit-mètre capillaire permettent d'obtenir le débit gazeux désiré.

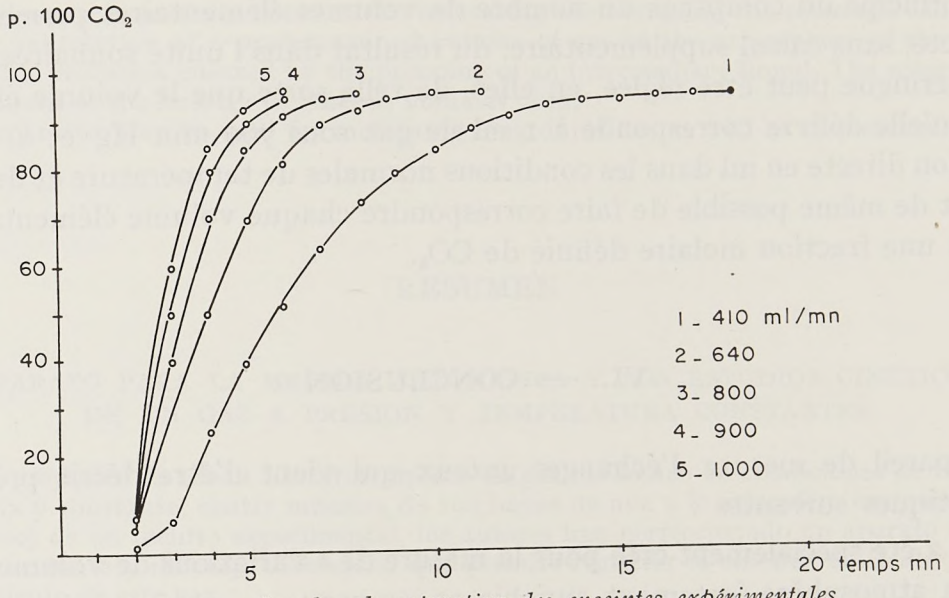


FIG. 5. — *Courbes de saturation des enceintes expérimentales*

3. *Étanchéité*

Des essais de différents types de vannes ont montré que, malgré une complication mécanique un peu plus grande, les robinets à boisseau et robinets plats offraient, eu égard à la précision demandée, le maximum d'avantages : fuites les plus faibles par diffusion, pas de variation de volume, donc de pression dans l'atmosphère gazeuse, pendant leur manipulation.

L'étanchéité du système au gaz a été testée. La perte de CO_2 est de l'ordre de 1 ml en 4 heures.

4. *Qualité des mesures*

Les facteurs suivants interviennent dans la qualité des mesures :

— les pertes de gaz dans l'appareil ;

— les caractéristiques de la seringue : celle-ci est un type très simple de pompe

assurant une excellente reproductibilité du volume délivré, jointe à une bonne étan chéité. D'autre part, l'action d'une came excentrique à vitesse angulaire constan donne au piston une cinétique sinusoïdale favorable à un équilibrage sans oscillatio du liquide manométrique ;

— le positionnement des électrodes du manomètre. En effet, pour que le volum réel du gaz échangé soit égal à celui du volume liquide transféré, il faut que les pres sions en B, A et D, soient ramenées à la même valeur. Cette condition n'est rempli que pour une seule position des électrodes ;

— la sensibilité du manomètre. Une variation de la masse gazeuse en A entraî nant à volume constant une variation de pression de 8 mm de colonne d'eau, équivau à un volume gazeux de 1 ml dans les conditions de température et de pression utilisées La dénivellation de 4 mm du liquide manométrique (dans une branche du manomè tre) est très supérieure à la dénivellation correspondant au seuil du système détecteur

5. *Expression des résultats*

Le principe du comptage du nombre de volumes élémentaires permet l'expres sion directe, sans calcul supplémentaire, du résultat dans l'unité souhaitée.

La seringue peut être réglée, en effet, de telle sorte que le volume élémentaire liquide qu'elle délivre corresponde à 1 ml de gaz sous 760 mm Hg et à 0°C. D'où l'expression directe en ml dans les conditions normales de température et de pression.

Il est de même possible de faire correspondre chaque volume élémentaire à une masse ou une fraction molaire définie de CO_2.

VI. — CONCLUSION

L'appareil de mesure d'échanges gazeux qui vient d'être décrit présente les caractéristiques suivantes :

— il a été spécialement créé pour la mesure de « variations de volume » de CO_2 en atmosphère fortement enrichie en ce gaz ;
— il est adaptable aux dimensions de l'échantillon ;
— il est adaptable à l'importance des échanges gazeux ;
— il permet des études cinétiques automatiques, quel que soit le sens de l'échange gazeux ;
— il est utilisable pour des mesures de longue durée (plusieurs semaines) à pression constante ;
— il permet, après une phase inititale d'équilibrage, de garder constante la quantité de CO_2 dissoute dans l'échantillon durant toute l'expérience ;
— il évite, par la saturation en vapeur d'eau du CO_2 de balayage, une déshydratation partielle des échantillons ;
— il possède un système d'acquisition des résultats non susceptible d'erreurs ;
— il a été réalisé en choisissant des composants simples disponibles sur le marché et en adoptant une logique électromécanique (cames et microcontacts) peu onéreuse ;

— il est utilisable en respiromètre sous pression partielle d'oxygène constante : le CO_2 est alors piégé dans le ballon A au moyen d'une solution aqueuse de potasse. L'oxygène pur est contenu dans l'ampoule B.

Reçu pour publication en juin 1970.

SUMMARY

APPARATUS FOR AUTOMATIC MEASURE AND KINETIC RESEARCH OF A GAS AT CONSTANT PRESSURE AND TEMPERATURE

With the object of measuring carbonic gas exchanges at definite and constant temperatures between samples of 100 grape berries and the atmosphere highly enriched in CO_2 (95-98 p. 100) of an experimental enclosure, the experimenters were led to perfect an automatic apparatus with constant pressure, and differential wiring, recording he kinetics of the absorption and release of this gas.

The difference in pressure between the measuring enclosure and the reference cell causes the addition or subtraction of a predetermined volume of gas to the atmosphere of the measuring chamber. This process is ensured by the pumping of an intermediary liquid. The recording comes down to a count of the number of gaseous volumes used.

The apparatus may be used for measuring long durations as well as respiration measures.

RESUMEN

APARATO PARA LA MEDIDA AUTOMATICA Y LOS ESTUDIOS CINÉTICOS DE UN GAZ A PRESION Y TEMPERATURA CONSTANTES

Con el proposito de medir los intercambios de gaz carbonico en condiciones de temperatura determinada y constante, centre muestra de 100 bayas de uva y la atmosfera enriquecida en CO_2 (95-98 p. 100) de un recinto experimental, los autores han perfeccionado un aparato automatico a presion constante y montaje diferencial que permite registrar la cinética de la absorcion y del disprendimiento de este gaz.

La adicion o la soustraccion de un volumen predeterminado de gaz, del recinto de medida, son provocados por una diferencia de presion entre este ultimo y una celula de referencia. Este proceso es realizado por medio del bombeo de un liquido intermediario. El aparato registra el numero de volumenes de gaz puestos en movimiento.

Este aparato puede ser utilizado para medidas durante un largo periodo de tiempo o bien para medidas de respiration.

RIASSUNTO

APPARECCHIO PER LA MISURA AUTOMATICA E LO STUDIO CINETICO DEGLI SCAMBI D'UN GAS A PRESSIONE E TEMPERATURA COSTANTI

Allo scepo di misurare gli scambi, a temperatura definita costante, di gas carbonico tra dei campioni di 100 chicchi d'uva e l'atmosfera fortemente arricchita di CO_2 (95-98 p. 100) di un'area sperimentale, gli autori sono stati portati a realizzare un apparecchio automatico a pressione costante, con montaggio differenziale, che registra la cinetica dell'assorbimento e della emanazione di questo gas.

La differenza di pressione tra l'area di misura e la cellula di riferimento provoca l'addizione o la sottrazione di un volume predeterminato di gas all'atmosfera della camera di misura. Questa operazione è assicurata mediante pompaggio d'un liquido intermedio. La registrazione si riduce a un conteggio del numero di volumi gassosi messi in opera.

L'apparecchio puo' servire per delle misure di lunga durata come pure per delle misure di respirazione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chambroy Y., Flanzy C., André P., 1967. Absorption du gaz exogène par des baies de raisin placées en atmosphère enrichie en CO_2. (Diffusion restreinte).

Flanzy C., André P., Flanzy M., Chambroy Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. II. Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 89-102.

Heusner A., Stussi T., Dreyfus E., 1965. Application de la coulométrie à la mesure de la consommation d'oxygène. *Med. Electron. biol. engng.*, **3**, 39-56.

Louwerse W., Van Oorschot J. L. P., 1969. An assembly for routine measurements of photosynthesis, respiration and transpiration of intact plants under controlled condition. *Photosynthetica*, **3**, 305-315.

Maffly R. H., 1968. A conductometric method for measuring micromolar quantities of carbon dioxide. *Anal. Biochem.*, **23**, 252-262.

Marcellin P., Soudain P., Phan Phuc A., 1967. Le gaz carbonique des tissus des fruits étudié par perfusion d'air ou d'anhydride carbonique. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.*, **13**, 33-41.

Pita J. C., 1969. Potentiometric determination of carbon dioxide partial pressure and pH in ultramicro-volumes of biological fluids. *Anal. Chem.*, **41**, 273-278.

Rees T. C., 1969. An automatic method for the determination of carbon dioxide in bottled beer. *J. Inst. Brewing*, **75**, 465-468.

Soudain P., 1965. Diffusion de l'oxygène et du gaz carbonique à travers un fruit au cours de sa croissance. *Physiol. vég.*, **3**, 91-105.

Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F., 1964. *Manometric techniques*. 4e éd., Burgess Publish. Cy, Minneapolis. 102-105.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (3), 217-237.

ACIDES AMINÉS LIBRES ET POLYPEPTIDIQUES DU VIN

C. POUX et Andrée OURNAC
avec la collaboration technique de Modeste CAILLET et R. JOUBERT

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Les auteurs ont comparé les résultats analytiques donnés par les méthodes microbiologiques et par chromatographie sur colonne à l'aide de l'autoanalyseur « Technicon ». Les essais ont été réalisés sur des vins de *Vitis vinifera*, cépage Terret-Bourret. Le moût avait été stérilisé par chauffage et ensemencé soit par *Saccharomyces ellipsoïdeus* (moût naturel et moût supplémenté en azote, sous forme de tartrate neutre d'ammonium, à raison de 250 mg d'azote par litre), soit par *Kloeckera apiculata*.

Ils ont pu ainsi mettre en évidence un certain nombre de faits :

1° dans la majorité des cas, la voie microbiologique dose, avec les acides aminés libres, une partie des acides aminés engagés dans les peptides ;

2° les acides aminés libres du vin ne représentent qu'une faible partie de l'azote total (20 à 32 p. 100), la proline représentant à elle seule le tiers ou les deux tiers de cette fraction ;

3° les résultats obtenus sont en faveur d'une exsorption de peptides par les cellules de levure. Le pourcentage d'acides aminés engagés dans les peptides est très élevé pour la plupart d'entre eux (70 à 90 p. 100) ; seule la proline et l'acide γ-aminobutyrique sont principalement sous forme libre ;

4° l'exsorption des acides aminés et des polypeptides serait une caractéristique du microorganisme utilisé, mais pour chaque microorganisme la supplémentation du milieu en azote ammoniacal accroît le pourcentage de peptides rejetés d'une manière spectaculaire (il passe de 25 à 43,8 p. 100) ;

5° dans les essais qui font l'objet de ce travail, la glycine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et la lysine, forment les résidus les plus importants des composés polypeptidiques.

I. — INTRODUCTION

Le dosage automatique des acides aminés par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions devenant de plus en plus courant, il nous a paru intéressant de comparer les résultats analytiques donnés par les méthodes microbiologiques et par chromatographie sur colonne à l'aide de l'autoanalyseur « Technicon » comme cela a été réalisé il y a quelques années pour l'analyse microbiologique directe du vin et la chromatographie sur papier (LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD, 1961).

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les essais ont été réalisés sur des vins provenant d'un moût de raisins *Vitis vinifera*, du cépage Terret-Bourret (Domaine de Pech-Rouge, I. N. R. A. — Narbonne), présentant les caractéristiques analytiques suivantes : sucre en g par litre : 179,5 ; acidité totale en g de SO_4H_2 par litre : 3,85.

Les fermentations ont été conduites à la température de 25°C sur des moûts stérilisés par chauffage et ensemencés à l'aide de $1,5 \cdot 10^6$/ml, soit de *Saccharomyces ellipsoideus* (essai 1), soit de *Kloeckera apiculata* (essai 3). L'essai avec *S. ellipsoideus* est réalisé à la fois sur le moût naturel et sur le moût supplémenté en azote, sous forme de tartrate neutre d'NH_4, à raison de 250 mg d'azote par litre (essai 2).

Dix jours après la mise en fermentation, les vins sont séparés des lies et analysés.

A. — *Préparation des échantillons*

Les méthodes microbiologiques et chromatographiques utilisées pour le dosage des acides aminés nécessitent une déprotéinisation préalable des échantillons.

Comme dans un travail précédent (Poux, 1968), on précipite les protéines du vin par l'éthanol (1 vol. vin/4 vol. éthanol à 96°), à basse température (— 10°C), ces conditions permettant d'éviter une dénaturation (Boulanger et Bizerte, 1957).

Le surnageant alcoolique est séparé du précipité par centrifugation, puis débarrassé de l'alcool qu'il renferme par évaporation sous vide à 45°C ; on l'ajuste ensuite à un volume connu.

Cette solution déprotéinisée sert de base aux dosages microbiologiques (M), après neutralisation par NaOH et aux dosages par chromatographie (L et T), après fixation des acides aminés sur une colonne échangeuse de cations (Dowex 50), en vue d'éliminer les anions, les sucres et les polyphénols.

Le surnageant alcoolique à 77° contient, en même temps que les acides aminés libres (L), d'autres composés azotés solubles dans l'alcool à 77° comme des amides, des polypeptides et des protéines solubles qui peuvent, après hydrolyse acide, libérer un certain nombre de résidus d'acides aminés (T). Il semble évident, en raison de la faible teneur du vin en amides et en protéines solubles dans l'alcool (prolamines), que la différence entre les teneurs en acides aminés totaux et libres (T — L) donne la mesure des acides aminés engagés surtout sous forme polypeptidique.

Nous définirons dans ce travail l'azote polypeptidique comme la fraction non précipitable dans l'alcool à 77°, les acides aminés libres exclus.

Préparation des échantillons pour la chromatographie sur colonne.

La technique de Bourdet et Hérard (1958) a été utilisée pour éliminer au maximum les impuretés des échantillons avant l'analyse chromatographique. Pour cela, on fait passer 50 ml de solution déprotéinisée correspondant à 50 ml de vin sur une colonne de 2,4 cm de diamètre remplie de Dowex 50 (X4 50, 100 mesh) sur 10 cm de hauteur.

Après rinçage de la colonne par H_2O distillée (environ 100 ml), les acides aminés sont élués par 350 ml de NH_4OH (N).

Les 60 premiers ml sont incolores, ils précèdent une fraction très colorée (140 ml), puis 150 ml de nouveau incolores.

L'élution des acides aminés a été suivie par chromatographie sur couche mince (Kurt Randerath, 1963).

adsorbant : Kieselguhr G-H_2O 30/60
solvant : *n*-propanol-H_2O 64/36
prise d'essai : 30 µl d'éluat
révélateur : ninhydrine 2 p. 100 dans le méthylcyclohexanol à 30 p. 100 d'acétone.

Tous les acides aminés passent dans la fraction colorée.

L'ammonium est éliminé de la totalité de l'éluat par évaporation sous vide à 45°C, le résidu est repris par H_2O distillée et son volume ajusté à 50 ml.

La chromatographie directe d'une partie aliquote de cette solution donne les acides aminés libres (L), tandis que la chromatographie après hydrolyse chlorhydrique (ClH 6 N) permet d'obtenir les acides aminés totaux comprenant à la fois les acides aminés libres et les peptides (polypeptides et amides) (T).

L'hydrolyse est effectuée de la façon suivante :

Dans une ampoule, on introduit 2 ml de la solution déprotéinisée et 2 ml de HCl pur (12 N environ). On fait le vide, puis on remplit l'ampoule d'azote. On scelle. On maintient cette ampoule à l'étuve à 110°C pendant 24 heures. L'hydrolysat est ensuite débarrassé d'HCl en l'amenant plusieurs fois à sec par évaporation sous vide à 50°C et finalement en le maintenant 12 à 24 heures dans un dessiccateur renfermant des pastilles de NaOH et dans lequel on a fait le vide.

Le résidu est dissous dans 2 ml d'H_2O contenant 1 p. 100 d'acide caprylique (pour éviter les contaminations), puis centrifugé pour le séparer du très léger dépôt de matières humiques qui pourrait s'être formé au cours de l'hydrolyse.

Une partie aliquote de l'hydrolysat est prise pour être chromatographiée sur colonne (0,5 à 1 ml).

B. — *Dosage microbiologique (M)*

La description de cette technique a fait l'objet de nombreux travaux, parmi lesquels nous citerons ceux de Snell (1957), Castor (1953), Adrian (1955, 1958, 1960), Block et Weiss (1956), Lafon-Lafourcade et Peynaud (1959, 1961), Genevois (1964).

Pour la réalisation de cette méthode, nous utilisons le milieu de base préconisé par Adrian (1960), étendu aux dosages des acides aminés : acide aspartique, glycine, proline, sérine, tyrosine, acide glutamique après addition de glutamine (Block et Weiss, 1956) et de l'alanine, après addition de leucovorin (Block et Weiss, 1956). Les microorganismes-test suivants sont utilisés :

Lactobacillus arabinosus 17/5 n° 8014 ATCC.

Acide glutamique	selon Block et Weiss (1956)		
Leucine	—	—	—
Isoleucine	—	—	—
Tryptophane	—	—	—
Valine	—	—	—

Leuconostoc mesenteroides P 60 n° 8042 ATCC.

Acide aspartique	selon Block et Weiss (1956)		
Cystine	—	—	—
Glycine	—	—	—
Histidine	—	—	—
Lysine	selon Lafon-Lafourcade et Peynaud (1959)		
Méthionine	selon Block et Weiss (1956)		
Phénylalanine	—	—	—
Proline	—	—	—
Sérine	—	—	—
Tyrosine	—	—	—

Leuconostoc citrovorum n° 8081 ATCC.

Alanine	selon Block et Weiss (1956)

Streptococcus faecalis n° 9790 ATCC.

Arginine	selon Block et Weiss (1956)		
Thréonine	—	—	—

Dans des travaux antérieurs, on a pu noter que les dosages de la thréonine réalisés avec les *Lactobacillus arabinosus* 17/5 donnent des résultats anormalement élevés, dus à l'action de stimulants dont certains ont été identifiés par Stokes et Gunness (1952) comme étant le pyridoxal ou la pyridoxamine. Cette exaltation a été aussi signalée dans la bière de Sorgho par Adrian (1959). De même que Steele, Sauberlich, Reynolds et Bauman (1949) et Block et Weiss (1956), nous avons retenu le *Streptococcus faecalis* comme microorganisme-test pour la dosage de cet acide aminé, ce microorganisme ne présentant pas d'effets de stimulation.

C. — *Dosage par chromatographie automatique sur résine*

Le principe du dosage est dû à Moore et Stein (1954) ; il est réalisé en continu dans l'auto-analyseur Technicon équipé d'une colonne de 1,40 m de hauteur remplie de résines cationiques, type chromobeads, constituées de polystyrène sulfoné avec chaîne latérale de divinylbenzène, le taux de réticulation étant de 8 p. 100. L'élution de la colonne est effectuée par des solutions

à gradient continu de force ionique et la résolution d'un chromatogramme est de 22 heures. L détermination quantitative des acides aminés se trouvant dans l'éluat est réalisée colorimét quement au moyen de la réaction à la ninhydrine. Après développement de la couleur, le mélan passe dans un colorimètre à cuve à flux continu et les variations de la densité optique du mélan à mesurer sont enregistrées en continu.

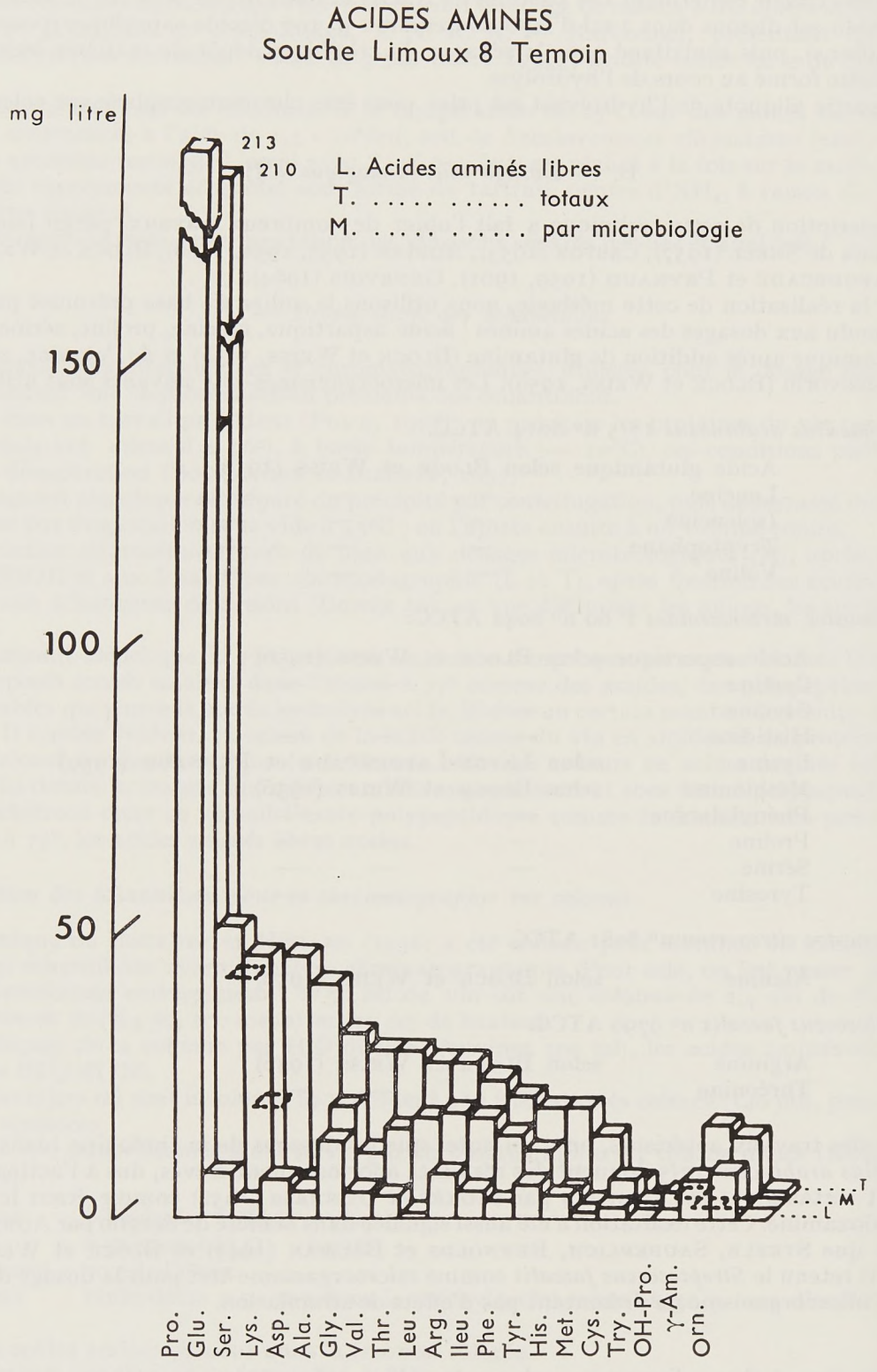


FIG. 1. — *Acides aminés en mg/l dosés par microbiologie et par chromatographie automatique sur résine*

Milieu : Moût de Terret-Bourret stérilisé par chauffage (Essai Témoin).

Microorganisme utilisé : Saccharomyces cerevisiae (Souche L. 8) ensemencement à $1{,}5 \cdot 10^6$ germes/ml

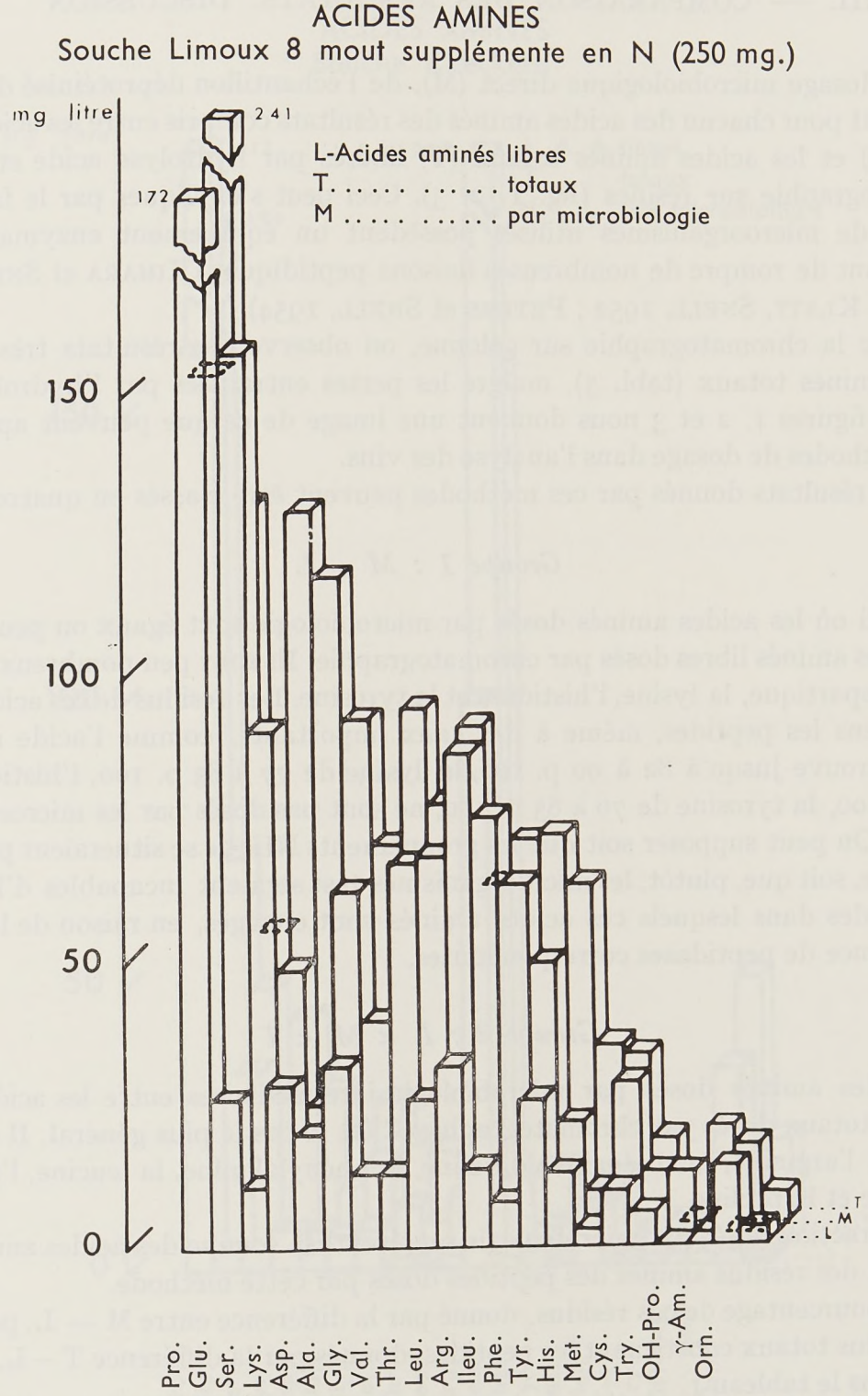


FIG. 2. — *Acides aminés en mg/l dosés par microbiologie et par chromatographie automatique sur résine*

Milieu : Moût de Terret-Bourret stérilisé par chauffage (identique à l'essai 1), supplémenté par 250 mg/l de N du tartrate neutre de NH_4

Microorganisme utilisé : Saccharomyces cerevisiae (Souche L. 8) ensemencement à $1{,}5 \cdot 10^6$ germes/ml

III. — COMPARAISON DES RÉSULTATS. DISCUSSION

Le dosage microbiologique direct (M), de l'échantillon déprotéinisé donne ordinairement pour chacun des acides aminés des résultats compris entre les acides aminés libres (L) et les acides aminés totaux (T) libérés par hydrolyse acide et dosés par chromatographie sur résines (fig. 1, 2, 3). Ceci peut s'expliquer par le fait que les souches de microorganismes utilisés possèdent un équipement enzymatique leur permettant de rompre de nombreuses liaisons peptidiques (KIHARA et SNELL, 1952 ; KIHARA, KLATT, SNELL, 1952 ; PETERS et SNELL, 1954).

Avec la chromatographie sur colonne, on observe des résultats très élevés en acides aminés totaux (tabl. 5), malgré les pertes entraînées par l'hydrolyse acide.

Les figures 1, 2 et 3 nous donnent une image de ce que peuvent apporter ces deux méthodes de dosage dans l'analyse des vins.

Les résultats donnés par ces méthodes peuvent être classés en quatre groupes :

Groupe 1 : $M = L$

Celui où les acides aminés dosés par microbiologie sont égaux ou peu différents des acides aminés libres dosés par chromatographie. Ils sont peu nombreux ; ce sont l'acide aspartique, la lysine, l'histidine et la tyrosine. Les résidus de ces acides aminés inclus dans les peptides, même à des taux importants, comme l'acide aspartique qui s'y trouve jusqu'à 82 à 90 p. 100, la lysine de 77 à 83 p. 100, l'histidine de 52 à 91 p. 100, la tyrosine de 76 à 83 p. 100, ne sont pas dosés par les microorganismes utilisés. On peut supposer soit que les groupements NH_2 ne se situeraient pas en bout de chaîne, soit que, plutôt, les microorganismes-test seraient incapables d'hydrolyser les peptides dans lesquels ces acides aminés sont engagés, en raison de la perte ou de l'absence de peptidases correspondantes.

Groupe 2 : $L < M < T$

Acides aminés dosés par microbiologie intermédiaires entre les acides aminés libres et totaux dosés par chromatographie. C'est le cas le plus général. Il concerne : l'alanine, l'arginine, la thréonine, la valine, la phénylalanine, la leucine, l'isoleucine, la glycine et la proline.

La fraction dosée par microbiologie représente la somme des acides aminés libres du vin et des résidus aminés des peptides dosés par cette méthode.

Le pourcentage de ces résidus, donné par la différence entre M — L, par rapport aux résidus totaux constituant les peptides, donnés par la différence T – L, est représenté dans le tableau 1.

On peut voir que l'hydrolyse des peptides par les microorganismes-test n'est que partielle (sauf pour l'arginine, essais 2 et 3, pour l'isoleucine et la proline, essai 3).

Groupe 3 : $M > T$

Acides aminés dosés par microbiologie supérieurs aux acides aminés totaux par chromatographie.

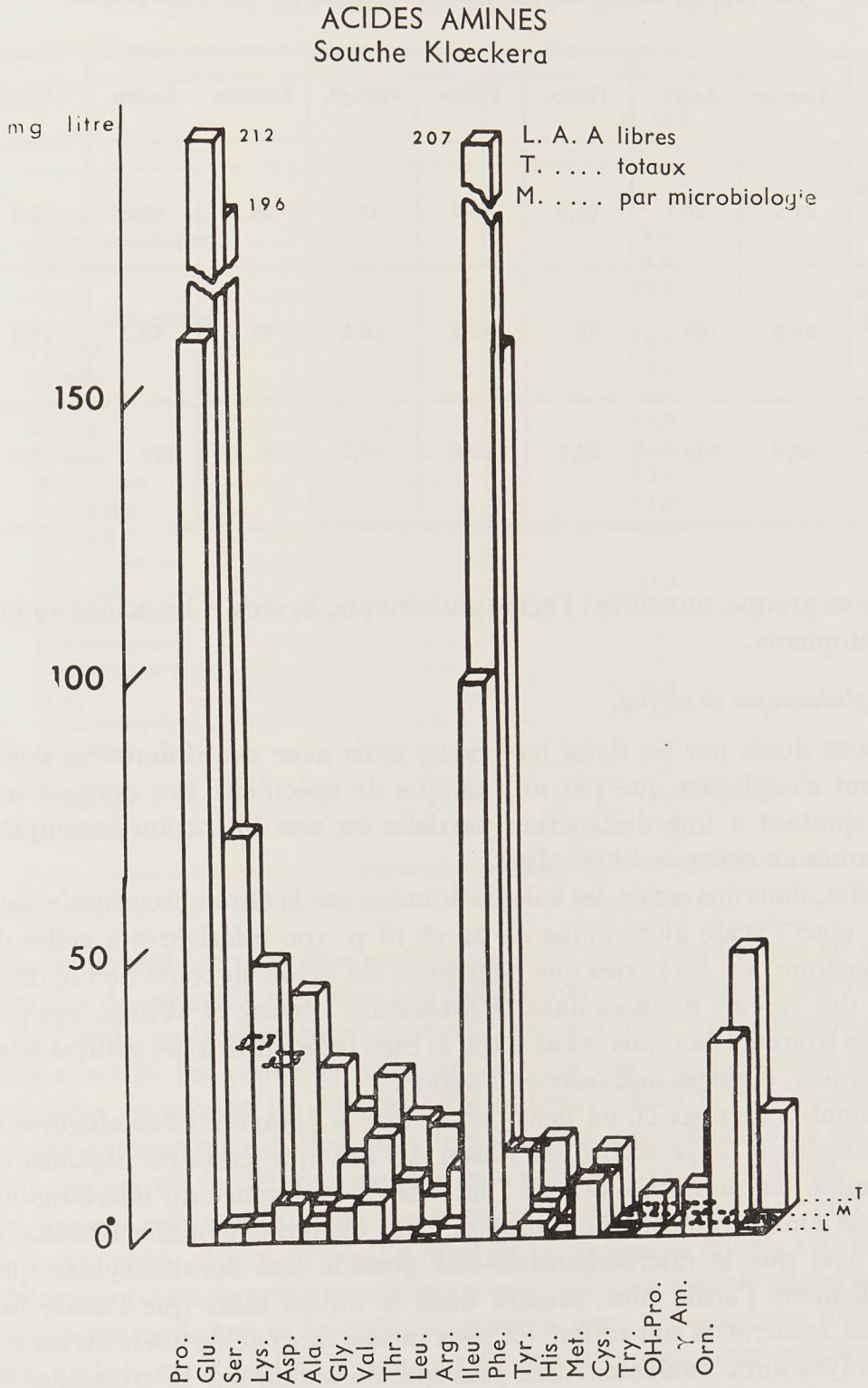


FIG. 3. — *Acides aminés en mg/l dosés par microbiologie et par chromatographie automatique sur résine*

Milieu : identique à l'essai 1.
Microorganisme utilisé : Klœckera apiculata, ensemencement à 1,5 · 10^6 germes/ml

TABLEAU I

Pourcentage de résidus aminés des peptides dosés par microbiologie (M-L) *par rapport aux résidus totaux* (T-L) *dosés par chromatographie*

	Alanine	Argin.	Thréo.	Valine	Phényl.	Leucine	Isoleu.	Glycine	Proline
S. cerevisiae Témoin (essai 1)	21,4	70,1	64,9	48,4	39	58	66,8	24,2	0
S. cerevisiae milieu supp. en N (essai 2)	50,8	100	86	67,8	50,4	95,4	89,7	46,2	0
K. apiculata Témoin (essai 3)	48,8	100	32,2	50,0	22,7	61,2	100	51,5	100

Dans ce groupe, on relève : l'acide glutamique, la sérine, les acides aminés soufrés et le tryptophane.

a) *Acide glutamique et sérine.*

Ils sont dosés par les deux méthodes, mais avec des différences considérables ne pouvant s'expliquer que par un manque de spécificité des dosages microbiologiques s'ajoutant à une destruction partielle ou une libération incomplète de ces acides aminés au cours de l'hydrolyse.

En effet, dans nos essais, les valeurs données par la chromatographie après hydrolyse sont pour l'acide glutamique de 22 et 18 p. 100 inférieures à celles du dosage microbiologique ; or, les pertes que peut subir cet acide au cours de l'hydrolyse sont, soit pour des valeurs données dans la littérature (Block et Weiss, 1956), soit pour des valeurs trouvées dans nos essais (tabl. 2) bien inférieures à ces chiffres et suggèrent, par conséquent, d'autres mécanismes d'action.

Au nombre de ceux-ci, on peut penser que le dosage microbiologique donne un résultat supérieur à la réalité en raison du fait que certains peptides contenant l'acide aminé en question exaltent l'activité de croissance du microorganisme plus que l'acide aminé libre. Si l'on suppose, par exemple, (comme Kihara, Klatt et Snell, 1952) que le microorganisme-test possède une décarboxylaxe qui dégrade continuellement l'acide libre présent dans le milieu alors que l'acide lié dans un peptide est soustrait à son action, on peut penser que l'acide libéré au fur et à mesure de l'hydrolyse aura finalement une plus grande action sur la croissance du microorganisme-test.

On peut aussi penser que le dosage microbiologique est affecté par des composés de structure voisine comme le feraient l'acide γ-aminobutyrique pour l'acide glutamique et l'éthanolamine pour la sérine. Nous avons effectué des essais avec ces derniers composés, mais nous n'avons pu mettre en évidence une interférence quelconque.

TABLEAU 2

Perte p. 100 en acides aminés au cours de l'hydrolyse
HCl 6N sous azote, température : 110°C, 24 h

	p. 100
Oxyproline	—
Acide aspartique	1,6
Thréonine	8,0
Sérine	15,0
Acide glutamique	—
Proline	8,8
Glycine	2,4
Alanine	1,6
Valine	4,0
Cystine	24,0
Méthionine	12,0
Isoleucine	1,6
Leucine	5,6
Norleucine	—
Tyrosine	11,2
Phénylalanine	7,2
Éthanolamine	—
γ-aminobutyrique	—
NH_3	90,4
Hydroxylysine	—
Ornithine	—
Lysine	—
Histidine	6,4
Arginine	4,0

Une autre hypothèse peut être envisagée pour l'acide glutamique en supposant qu'une quantité de cet acide peut être synthétisée au cours du dosage, par une transamination de l'acide α-cétoglutarique existant dans le milieu (SCHOFFENIELDS, 1967). Nous avons effectué des contrôles avec cet acide à des concentrarions de 40 µg à 200 µg par tube encadrant les teneurs où il se trouve dans le vin, et ceci dans les conditions des dosages microbiologiques de nos essais. Les résultats de ces contrôles ne nous ont pas permis de déceler une influence significative de cet acide.

Enfin, comme cela a été signalé par certains auteurs (TRISTRAM, 1966 ; BARNES, 1966 ; BOULTER, 1966), il se peut que l'hydrolyse de 24 heures utilisée soit insuffisante pour la libération totale de certains acides aminés, puisqu'il semble admis que chaque type de protéines ne donne ni les mêmes récupérations, ni les mêmes libérations de leurs acides aminés constitutifs ; il pourrait en être de même pour certains polypeptides de poids moléculaire élevé.

Il était donc intéressant de suivre l'hydrolyse des peptides du raisin en utilisant les méthodes préconisées par ces auteurs (TRISTRAM, 1966). Dans ce but :

on a d'abord déterminé la destruction, au cours de l'hydrolyse, d'un mélange d'acides aminés (tabl. 2), représentée dans les figures 4, 5, 6, par la droite descendante P ;

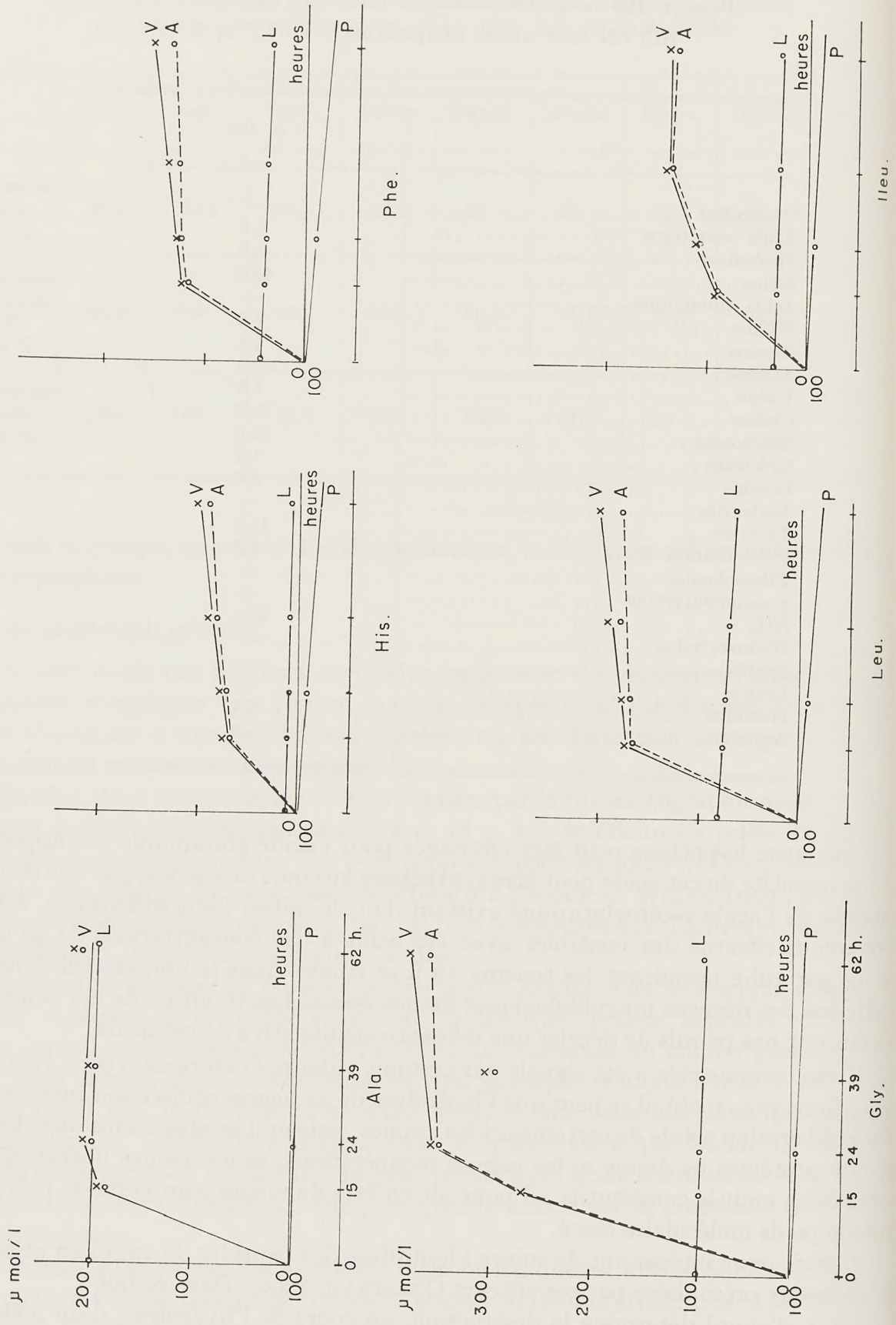

µ mol / l
200
100
0
100
V
A
L
heures
P
0
15
24
39
62 h.
Ala.
His.
Phe.
Leu.
Ileu.
Gly.
µ mol/l
300
200
100
0
100

FIG. 4

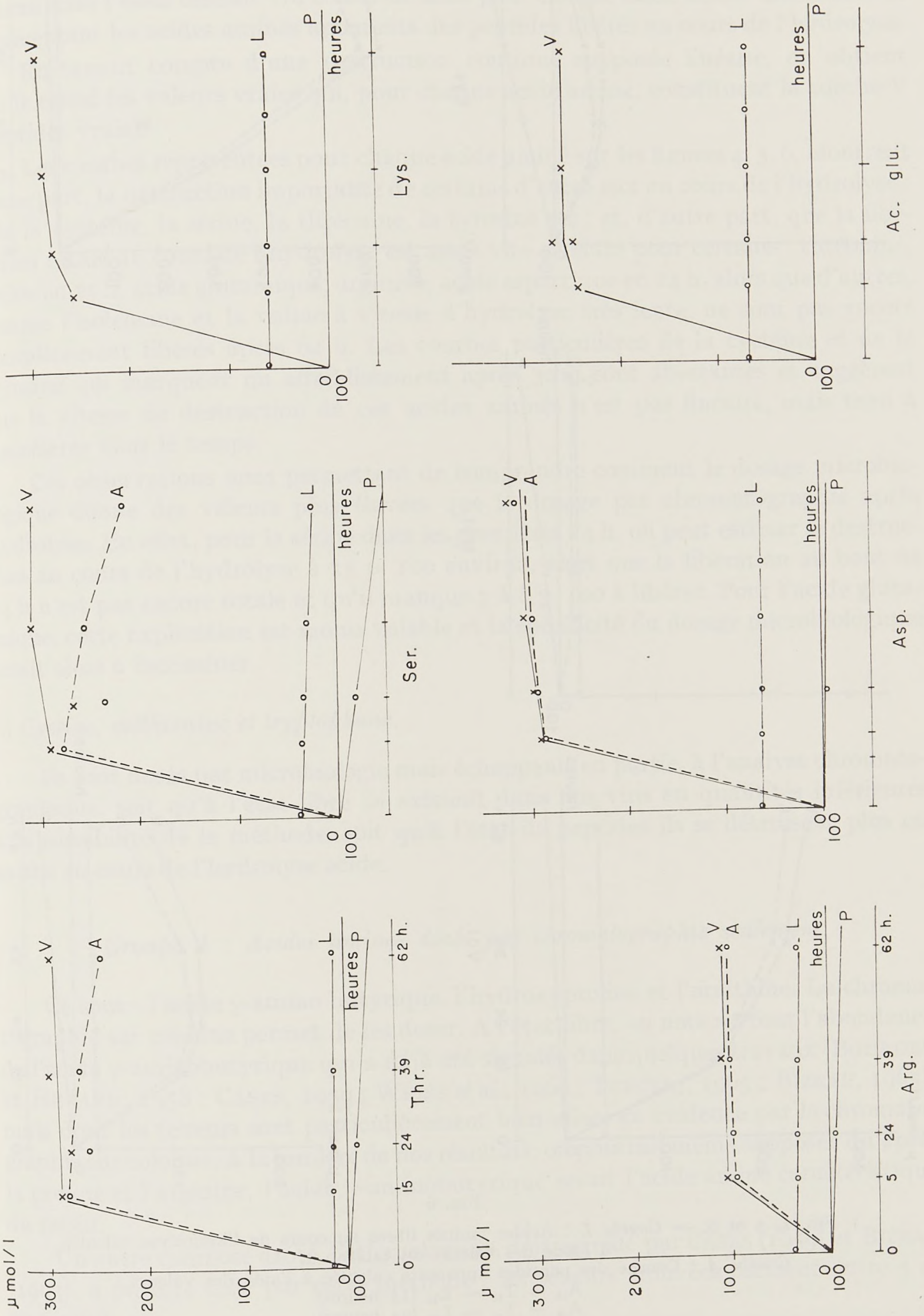

µ mol/l
300
200
100
0
100
V
A
L
P
heures
0
15
24
39
62 h.
Thr.
Ser.
Asp.
Arg.
Lys.
Ac. glu.

FIG. 5

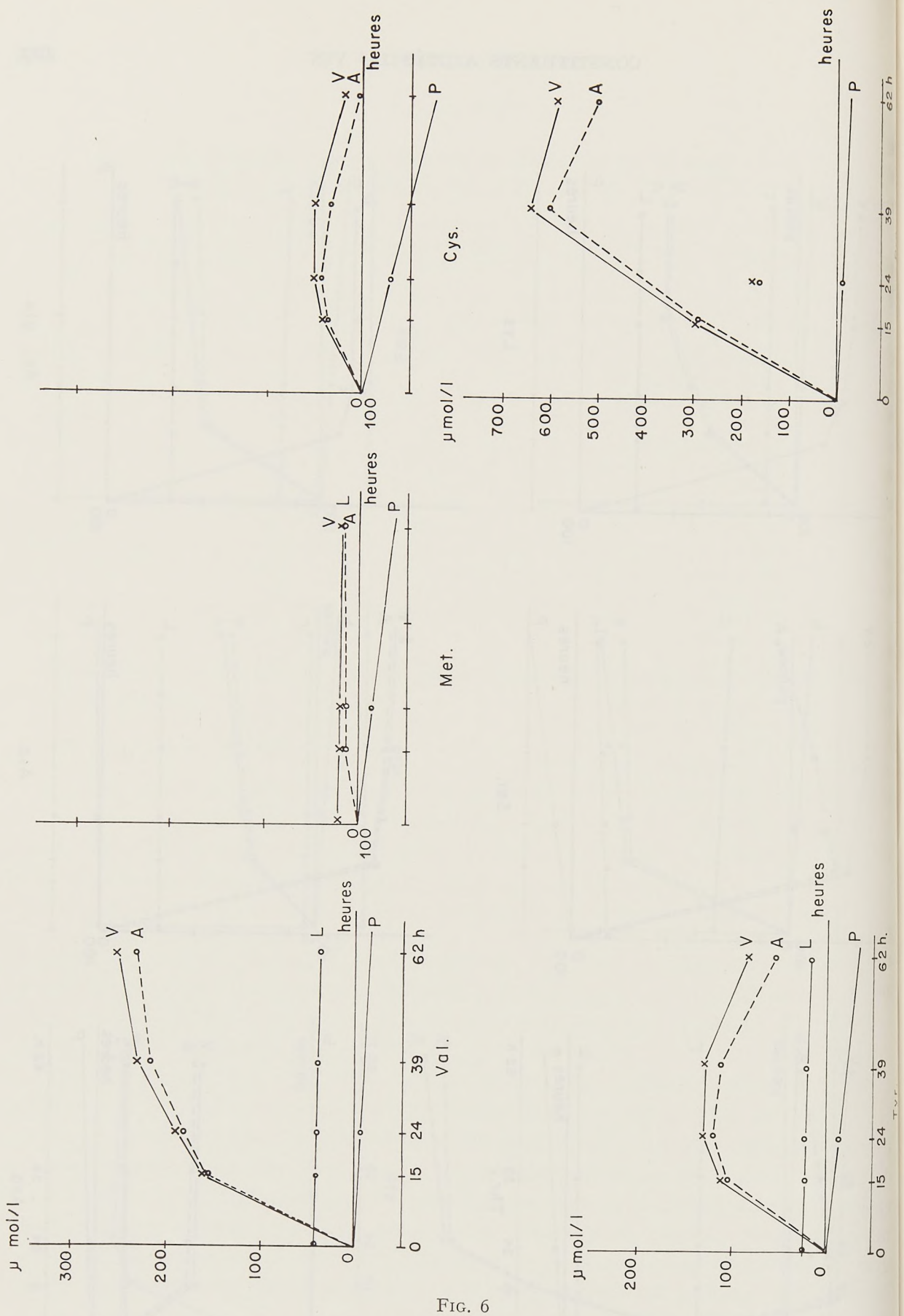


FIG. 6

FIG. 4, 5 et 6. — *Courbe L* : Acides aminés libres au cours de l'hydrolyse calculés à l'aide des valeurs du tableau 2.

Courbe A : Courbe des peptides apparents calculée à l'aide des valeurs :

$A_{15} = T_{15} - L_{15}$ (15 heures)

$A_{24} = T_{24} - L_{24}$ (24 heures)

... etc

Courbe V : Courbe des peptides vrais, soit :

$V_{15} = A_{15}$ + Pertes calculées

... etc

(Pour simplifier, on a admis qu'au cours de la libération des acides aminés entre deux intervalles de temps d'hydrolyse, la destruction s'effectuerait sur la moitié de la quantité libérée comme si cette libération était linéaire.)

puis, on a suivi au cours du temps (15 h, 24 h, 39 h, 62 h), la libération des différents acides aminés d'un mélange d'acides aminés libres et de polypeptides obtenu dans l'essai témoin. On construit ainsi pour chaque acide aminé une courbe A représentant les acides aminés apparents des peptides libérés au cours de l'hydrolyse.

En tenant compte d'une destruction continue supposée linéaire, on obtient par le calcul les valeurs vraies qui, pour chaque acide aminé, constituent la courbe V (peptides vrais).

Les courbes représentées pour chaque acide aminé sur les figures 4, 5, 6, montrent d'une part, la destruction importante de certains d'entre eux au cours de l'hydrolyse : tels la cystéine, la sérine, la thréonine, la tyrosine etc ; et, d'autre part, que la libération totale au cours de l'hydrolyse est assez vite atteinte pour certains : thréonine, sérine en 15 h, acide glutamique, arginine, acide aspartique en 24 h, alors que d'autres, comme l'isoleucine et la valine à vitesse d'hydrolyse très lente, ne sont pas encore complètement libérés après 62 h. Les courbes particulières de la cystéine et de la tyrosine qui marquent un affaiblissement après 39 h sont aberrantes et suggèrent que la vitesse de destruction de ces acides aminés n'est pas linéaire, mais tend à s'accélérer dans le temps.

Ces observations nous permettent de comprendre comment le dosage microbiologique donne des valeurs plus élevées que le dosage par chromatographie après hydrolyse. En effet, pour la sérine dans les premières 24 h, on peut estimer la destruction au cours de l'hydrolyse à 15 p. 100 environ, alors que la libération au bout de 24 h n'est pas encore totale et qu'il manque 7 à 8 p. 100 à libérer. Pour l'acide glutamique, cette explication est moins valable et la spécificité du dosage microbiologique serait alors à incriminer.

b) *Cystine, méthionine et tryptophane.*

Ils sont dosés par microbiologie mais échappent, en partie, à l'analyse chromatographique, soit qu'à l'état libre ils existent dans nos vins en quantités inférieures à la sensibilité de la méthode, soit qu'à l'état de peptides ils se détruisent plus ou moins au cours de l'hydrolyse acide.

Groupe 4 : Acides aminés dosés par chromatographie seulement

Ce sont : l'acide γ-amino butyrique, l'hydroxyproline et l'ornithine. La chromatographie sur colonne permet de les doser. A l'état libre, on note surtout l'abondance de l'acide γ-aminobutyrique qui a déjà été signalée dans quelques travaux (Bourdet et Hérard, 1958 ; Cases, 1959 ; Weiss *et al.*, 1960 ; Tercelj, 1965 ; Bizeau, 1965), mais dont les teneurs sont particulièrement bien mises en évidence par la chromatographie sur colonne. A la lumière de nos résultats, on pourrait même supposer qu'après la proline et l'arginine, l'acide γ-aminobutyrique serait l'acide aminé caractéristique du raisin.

Un autre composé azoté, l'éthanolamine, déjà signalé par Cases (1959) et Bizeau (1963), a pu être dosé par cette méthode ; les teneurs trouvées oscillent entre 5 et 12,6 mg/l.

IV. — IMPORTANCE DE LA FRACTION AMINÉE ET POLYPEPTIDIQUE DU VIN

Les différentes fractions azotées du vin ont déjà fait l'objet de nombreuses estimations par des méthodes très différentes que nous n'envisagerons pas ici. Pour la fraction polypeptidique, HENNING (1943), PEYNAUD (1950), BOURDET et HÉRARD (1958), LAFOND-LAFOURCADE et PEYNAUD (1961), présentent des résultats fort dissemblables. BOURDET et HÉRARD (1958) considèrent eux-mêmes que la méthode qu'ils ont employée est peu significative. LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (1961) estiment ces polypeptides par des différences entre le dosage microbiologique sans hydrolyse et le dosage par chromatographie sur papier des acides aminés libres. Les polypeptides totaux sont donnés par une différence entre l'azote total et la somme azote ammonical + azote aminé + azote protéique.

La méthode par chromatographie sur colonne employée au cours de ce travail estimant les acides aminés et les peptides avant et après hydrolyse acide sur un liquide déjà purifié par précipitation à l'alcool et passage sur résine, doit permettre de fournir sur cette fraction de composés azotés des estimations beaucoup plus précises permettant d'approcher les valeurs réelles.

L'importance de ces fractions apparaît dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Différentes formes d'azote dans les vins

		N total	N des A. A. libres totaux	N de la proline	N peptidique (T-L)
Essai *1*	mg	164,3	39,9	25,9	41,22
	p. 100	100	24,3	15,8	25,0
Essai *2*	mg	304,2	64,5	21,0	133,31
	p. 100	100	21,2	6,9	43,8
Essai *3*	mg	214,8	68,9	19,7	61,1
	p. 100	100	32,0	9,1	28,4

Les essais sont obtenus avec le même jus de raisin stérilisé :
— Essai 1 : fermentation par *S. cerevisiae*
— Essai 2 : fermentation par *S. cerevisiae* avec addition de N (250 mg/l)
— Essai 3 : fermentation par *K. apiculata*

On voit que les acides aminés libres du vin représentent une faible partie de l'azote total, environ 20 p. 100 pour les essais 1 et 2 et 32 p. 100 pour l'essai 3. La proline représente d'ailleurs, à elle seule, 1/3 à 2/3 de ce pourcentage. Le pourcentage plus élevé de l'essai 3 est dû non seulement à l'abondance de la proline, mais aussi de l'arginine qui n'a pas été assimilée durant la fermentation par le microorganisme mis en œuvre (*Kloeckera apiculata*, fig. 3).

L'azote polypeptidique n'est guère plus important (25 à 28 p. 100, dans les essais 1 et 3) que celui des acides aminés libres correspondants. Toutefois, on peut voir que la supplémentation en azote ammoniacal, essai 2, accroît le pourcentage des peptides rejetés d'une manière spectaculaire, puisqu'il passe de 25 p. 100 à 43,8p. 100.

Les acides aminés qui constituent les peptides sont rassemblés dans le tableau 4 où ils sont classés globalement d'après l'importance quantitative en millimolécules.

TABLEAU 4

Acides aminés constituant les peptides

Résultats exprimés en mg/l et en mmol/l

	S. cerevisiae Témoin Essai 1		*S. cerevisiae* Supplémenté Essai 2		*Kloeckera apiculata* Essai 3	
	mmol/l	mg/l	mmol/l	mg/l	mmol/l	mg/l
Glycine	0,281	21,1	0,715	53,7	0,253	19,0
Acide aspartique	0,248	33,1	0,701	93,4	0,191	25,5
Lysine	0,248	36,3	0,663	96,9	0,230	33,6
Acide glutamique	0,214	31,5	0,690	101,5	0,192	28,3
Thréonine	0,194	23,1	0,402	48,0	0,127	15,2
Valine	0,187	21,9	0,669	78,4	0,152	17,8
Alanine	0,161	14,4	0,630	56,1	0,147	13,1
Leucine	0,123	16,2	0,425	55,8	0,116	15,2
Sérine	0,120	12,7	0,397	41,7	0,138	14,5
Isoleucine	0,110	14,5	0,454	59,6	0,096	12,6
Arginine	0,092	16,0	0,263	45,8	0,324	56,5
Tyrosine	0,069	12,5	0,256	46,5	0,030	5,4
Histidine	0,066	10,3	0,185	28,8	0,076	11,8
Phénylalanine	0,060	10,0	0,264	43,6	0,072	11,9
Hydroxyproline	0,051	6,7	0,132	17,3	0,065	8,6
Acide γ-aminobutyrique	0,026	2,7	0,006	0,6	0,115	11,9
Méthionine	0,004	0,7	0,135	20,1	0,000	0,0
Ornithine	0,004	0,6	0,019	2,5	0,044	5,8
Proline	0,000	0,0	0,597	68,7	0,295	34,0
Cystine	0,000	0,0	0,040	9,7	0,000	0,0
Tryptophane	0,000	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0
Éthanolamine	0,013	0,8	0,000	0,0	0,000	0,0

Dans nos essais, ce sont la glycine, les acides aspartique et glutamique et la lysine qui forment les éléments les plus importants de ces composés polypeptidiques.

Lorsqu'on envisage le pourcentage des acides aminés engagés dans les peptides, il est remarquable de constater qu'il est très élevé pour la plupart d'entre eux, 70 à 90 p. 100 (fig. 7 et 8), seuls la proline et l'acide γ-aminobutyrique se trouvent principalement sous forme libre. Ce fait, qui semble n'avoir pu être mis en évidence avec les méthodes employées précédemment, nous présente cette fraction azotée sous un aspect nouveau, à la fois sur le plan quantitatif et qualitatif. Non seulement cette fraction polypeptidique est globalement importante, comme cela a été déjà signalé, mais encore on peut, avec cette méthode, déceler quels sont les acides aminés préférentiellement engagés dans des édifices polypeptidiques que les microorganismes

rejettent par leur propriété d'exsorption. Dans une mise au point récente, Dupuy Morfaux et Usciati (1967), ne signalent pas que l'exsorption des acides aminés s'accompagne de celle des polypeptides, bien qu'ils indiquent des cas où le séjour des vins sur levures augmente leur teneur en composés azotés.

ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES

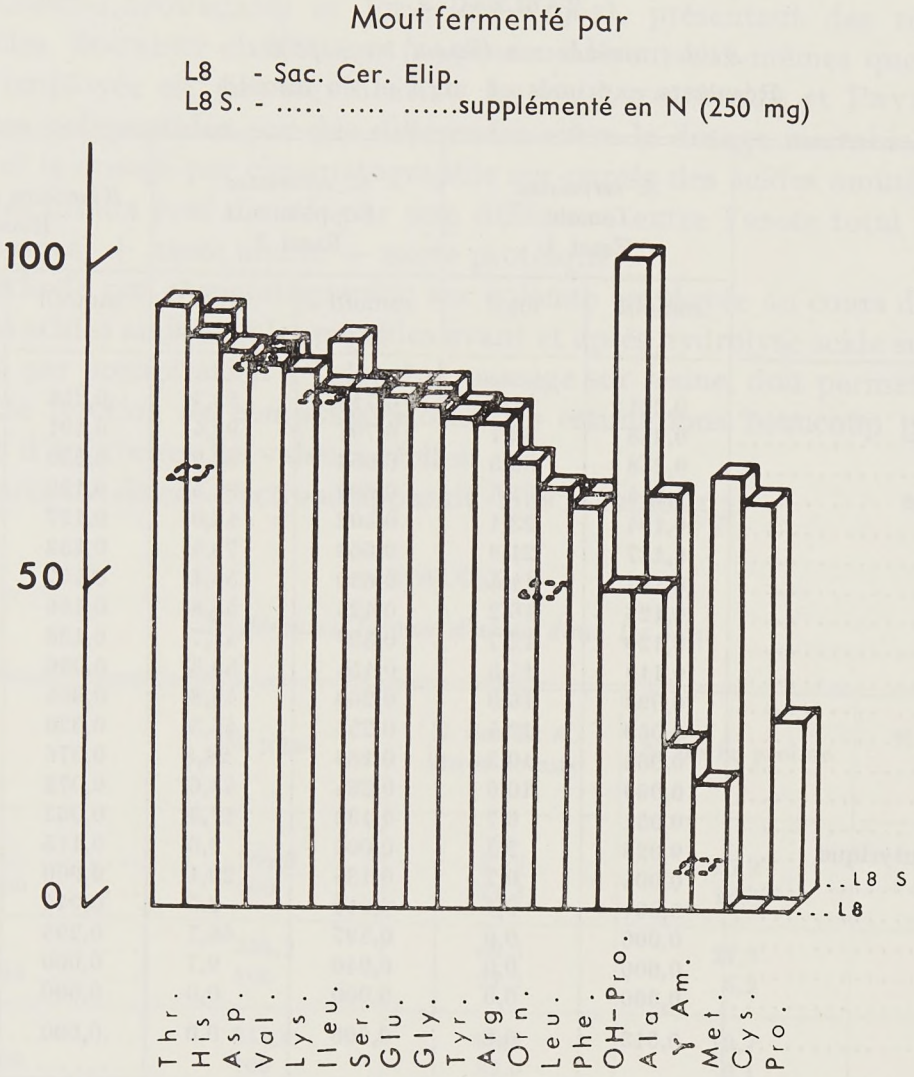


Fig. 7. - *Pourcentage d'acides aminés inclus dans les peptides de vins issus de moûts naturels ou supplémentés en NH_4*

Souches : *Saccharomyces cerevisiae* L. 8 (Essai Témoin et supplémenté)

De plus, en comparant les pourcentages des acides aminés inclus dans les peptides des vins issus de moûts naturels et supplémentés en NH_4, fermentés par la même souche (fig. 7), on constate qu'ils sont très voisins dans les deux cas. Ces résultats reflètent donc la même exsorption de peptides pour le même microorganisme, ce qui paraît normal, en raison des conceptions actuelles sur ce phénomène lié à la synthèse des acides aminés, laquelle est, elle-même, sous la dépendance du génotype. Cette exsorption est toutefois exaltée par l'addition d'ammonium (69,3 p. 100). Et il convient de noter aussi que les peptides de l'essai 2 sont nettement plus riches en acides aminés

soufrés (cystine et méthionine) et en acides aminés dérivés du pyrrole (proline et oxyproline).

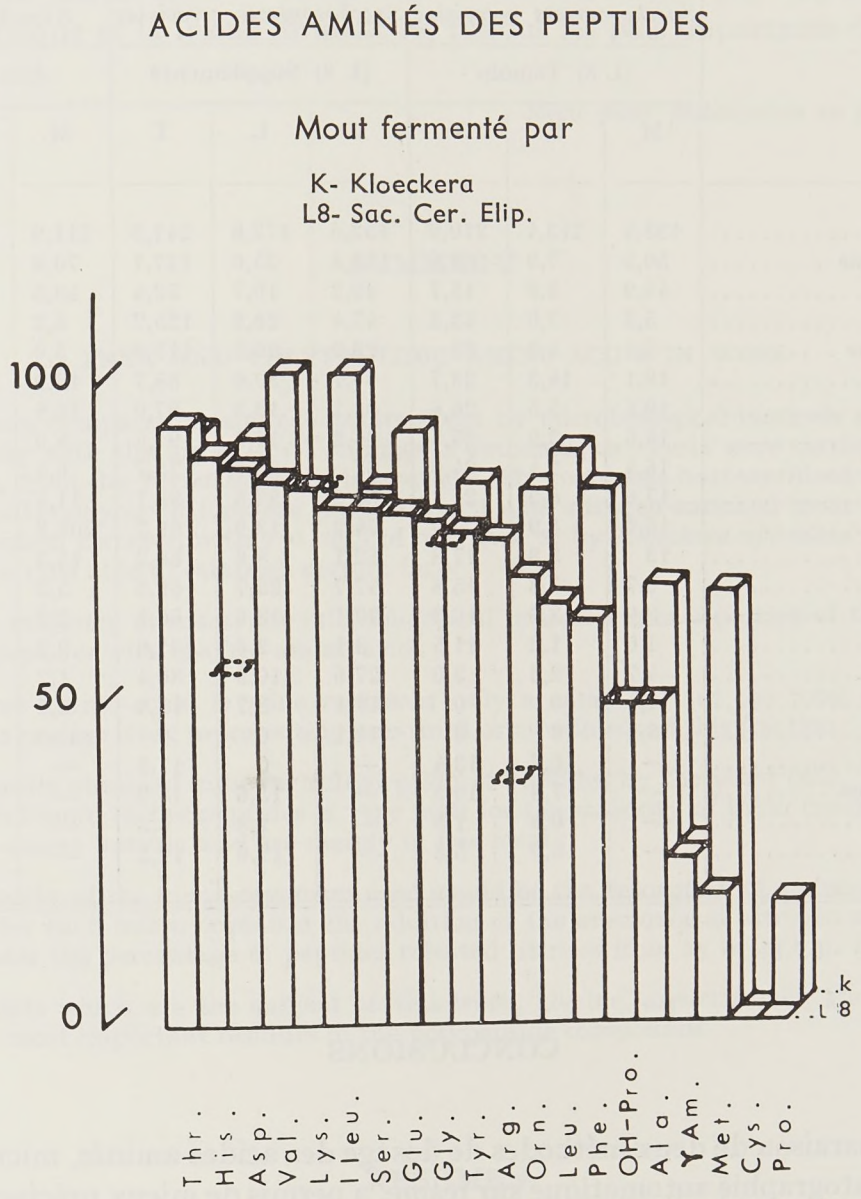


FIG. 8. — *Pourcentages d'acides aminés inclus dans les peptides de vins issus de moûts naturels ou supplémentés en* NH_4.

Souches : *Saccharomyces cerevisiae* L. 8 (Essai Témoin) et *Kloeckera apiculata*

Lorsqu'on compare les peptides des vins résultant de l'ensemencement du moût par des microrganismes différents (*Kloeckera apiculata* et *Saccharomyces ellipsoideus*), on peut voir alors que les peptides exsorbés diffèrent sensiblement les uns des autres, car les variations observées pour chaque acide aminé sont quelquefois trés importantes (fig. 8 et tableau 5). Ces variations affectent plus spécialement le pourcentage des résidus inclus des familles de l'acide glutamique (acide glutamique (+), arginine (-), ornithine (+), proline (+), lysine (=)) et de la famille dérivant de l'acide pyruvique (valine (+), alanine (+), leucine (+)).

TABLEAU 5

Teneur en acides aminés de trois vins en mg/l

	Saccharomyces cerevisiae (L 8) Témoin			*Saccharomyces cerevisiae* (L 8) Supplémenté			*Kloeckera apiculata*		
	M	L	T	M	L	T	M	L	T
Proline	138,4	213,4	210,9	152,6	172,6	241,3	211,9	161,7	195,7
Acide glutamique	50,5	7,9	39,4	155,8	25,6	127,1	70,8	2,9	31,2
Sérine	44,9	3,0	15,7	89,3	10,7	52,4	48,5	3,1	17,6
Lysine	5,3	7,0	43,3	47,4	28,8	125,7	6,2	7,3	40,9
Acide aspartique	5,1	4,9	38	22,9	20,5	113,9	5,0	2,7	28,3
Alanine	18,1	14,3	28,7	61,1	32,6	88,7	12,9	6,5	19,6
Glycine	10,6	5,5	26,6	38,1	13,3	67,0	16,9	7,1	26,1
Valine	14,5	3,9	25,8	66,2	13,0	91,4	8,9	0	17,8
Thréonine	16,4	1,4	24,5	67	25,7	73,7	6,4	1,5	16,7
Leucine	17,6	8,2	24,4	85,6	32,6	88,1	11,4	2,1	17,8
Arginine	16,1	4,9	20,9	74,2	13,9	59,7	206,8	100,3	156,8
Isoleucine	13	3,3	17,8	62,1	8,6	68,2	14,3	—	12,6
Phénylalanine	9,7	5,8	15,8	47,7	25,7	69,3	5,3	2,6	14,3
Tyrosine	3,0	3,8	16,3	20,1	13,6	60,1	2,2	1,1	6,3
Histidine	1,0	1,2	11,5	8,1	2,8	31,6	9,2	10,5	22,8
Méthionine	4,7	2,3	3,0	27,6	10,3	30,4	1,2	0,4	0
Cystine	1,1	0	0	11,1	5,7	15,4	5,7	0	0
Tryptophane	3,3	0	0	11,1	0	0	traces	0	0
Hydroxyproline	—	6,7	13,4	—	0	17,3	—	9,2	17,8
γ-aminobutyrique	—	7,8	10,5	—	13,6	14,2	—	35,5	47,4
Ornithine	—	0,4	1,0	—	2,8	5,3	—	1,3	7,1
Éthanolamine	—	5,0	5,8	—	12,6	12,2	—	11,3	10

CONCLUSIONS

La comparaison de deux méthodes de dosage des acides aminés, microbiologiqu et par chromatographie automatique sur résine, a permis de mieux préciser les teneur en certains composés azotés et de mettre en évidence des faits qui, à notre connais sance, n'ont pas été signalés jusqu'à présent :

1° dans la majorité des cas, la voie microbiologique dose, avec les acides amin libres, une partie des acides aminés engagés dans les peptides ;

2° les acides aminés libres du vin ne représentent qu'une faible partie de l'azot total (20 à 32 p. 100), la proline représentant, à elle seule, le tiers ou les deux tier de cette fraction ;

3° les résultats obtenus sont en faveur d'une exsorption de peptides par le cellules de levure. Le pourcentage d'acides aminés engagés dans les peptides est trè élevé pour la plupart d'entre eux (70 à 90 p. 100) ; seuls la proline et l'acide γ-ami nobutyrique sont principalement sous forme libre ;

4° l'exsorption des acides aminés et des polypeptides serait une caractéristique du microorganisme utilisé, mais pour chaque microorganisme la supplémentation du milieu en azote ammoniacal accroît le pourcentage de peptides rejetés d'une manière spectaculaire (il passe de 25 à 43,8 p. 100) ;

5° dans les essais qui font l'objet de ce travail, la glycine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et la lysine forment les résidus les plus importants des composés polypeptidiques.

Reçu pour publication en juin 1970.

SUMMARY

FREE AND POLYPEPTIDIC AMINO-ACIDS IN WINE

The authors compared analytical results given by microbiological methods and by column chromatography with the aid of a « Technicon » autoanalyser. Tests were carried out on *Vitis vinifera* wines, from the *Terret-Bourret* vine variety. The must was heat-sterilized and inoculated either with *Sacharomyces ellipsoideus* (natural must and nitrogen-enriched must in the form of neutral ammonium tartrate, with 250 mg/l of nitrogen) or by *Kloeckera apiculata*.

They were thus able to establish certain facts :

1° in the majority of cases, the microbiological process mixes a portion of the amino-acids bound in the peptides with the free amino-acids ;

2° the free amino-acids in wine represent only a small part of the total nitrogen (20 to 32 p. 100), the proline itself representing one-third or two-thirds of this fraction ;

3° the results obtained indicate a desorption of peptides by the yeast cells. The percentage of amino-acids bound in the peptides is very high for the majority of them (70-90 p. 100) ; only proline and γ-amino butyric acid are mainly in free form ;

4° a property of the micro-organism used would be the desorption of amino-acids and polypeptides but for each micro-organism the addition of the ammoniacal nitrogen medium spectacularly increases the percentage of peptides rejected (it rises from 25 to 43,8 p. 100) ;

5° in the tests which are the subject of this work, glycine, aspartic acid, glutamic acid and lysine are the most important residues of the polypeptide compounds.

RESUMEN

ACIDOS AMINOS LIBRES Y POLIPEPTIDICOS DEL VINO

Los autores han procedido a la comparación de los resultados analíticos dados por los métodos microbiológicos y por cromatografía sobre columna, por medio del autoanalizador « Technicon ». Los ensayos han sido realizados con vinos de *Vitis vinifera*, cepa *Terret-Bourret*. El mosto hasido esterilizado por calentamiento y sembrado, ya sea por *Sacharomyces ellipsoideus* (mosto natural y mosto enriquecido en nitrógeno, en forma de tartrato neutro de amonio, a razón de 250 mg de nitrógeno por litro), o bien por *Kloeckera apiculata*.

De este modo, ha sido posible hacer resaltat cierto número de hachos :

1° en la mayor parte de los casos, la vía microbiológica dosifica, con los ácidos aminos libres, una parte de los ácidos aminos introducidos en los péptidos.

2° Los ácidos aminos libres del vino únicamente representan una parte reducida del nitrógeno total (20 a 32 p. 100), representado la prolina — por sí sola — la tercera o las dos terceras partes de esta fracción ;

3° los resultados obtenidos abundan en favor de una exsorpción de péptidos por las célu de levadura. El porcentaje de ácidos aminos introducidos en los péptidos es muy elevado para mayor parte de los mismos (70 a 90 p. 100) ; únicamente la prolina y el ácido γ-aminobutírico encuentran principalmente en forma libre ;

4° la exsorpción de los ácidos aminos y de los polipéptidos parece constituir una característ del microorganismo utilizado, pero, para cada microorganismo el enriquecimiento del medio nitrógeno amoniacal incrementa el porcentaje de péptidos rechazados de forma espectacu (pasa de un 25 a un 43,8 p. 100) ;

5° en los ensayos objeto del presente trabajo, la glicina, el ácido aspártico, el ácido glutám y la lisina, forman los residuos más importantes de los compuestos polipeptídicos.

RIASSUNTO

AMMINOACIDI LIBERI E POLIPEPTIDICI DEL VINO

Gli autori hanno confrontato i risultati analitici ottenuti con metodi microbiologici e p cromatografia su colonna per messo dell'autoanalizzatore « Technicon ». Gli esperimenti so stati realizzati su dei vini di *Vitis vinifera*, vitigno *Terret-Bourret*. Il mosto era stato sterilizza sia per riscaldamento e con aggiunta di *Sacharomyces ellipsoideus* (mosto naturale e mosto arr chito in azoto, sotto forma di tartrato neutro d'ammonio, in ragione di 250 mg d'azoto al litr sia con aggiunta di *Kloeckera apiculata*.

Sono stati cosi' messi in evidenza un certo numero di risultati :

1° nella maggior parte dei casi il metodo microbiologico dosa con gli amminoacidi liber una parte degli amminoacidi che si trovano nei peptidi ;

2° gli amminoacidi liberi non rappresentano che una piccola parte (20/32 p. 100) dell'insie d'azoto, mentre la prolina da sola rappresenta uno o due terzi di questa frazione ;

3° i risultati ottenuti favoriscono la rimessa di peptifi attraverso le cellule di lievito. L percentuale di amminoacidi che si trovano nei peptidi è molto elevata per la maggior parte essi (70/90 p. 100) ; soltanto la prolina e l'acido amminobutirico sono principalmente sotto form libera ;

4° la rimessa degli amminoacidi e dei polipeptidi potrebbe essere una caratteristica d microorganismo utilizzato ; tuttavia, per ogni microorganismo l'arrichimento del mezzo in azo ammoniacale aumenta la percentuale di peptidi rigettati in modo spettacolare (essa passa d 25 al 43,8 p. 100).

5° negli esperimenti che fanno l'oggetto di questo lavoro, la glicina, l'acido aspartico, l'acid glutammico e la lisina, formano i residui più importanti dei composti polipeptidici.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adrian S., 1955. Nouvelle technique pour le dosage microbiologique simultané des acides aminés indis pensables et conditions de leur extraction en présence de glucides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 107-121

Adrian S., Rerat A., 1958. Méthodes d'évaluation de la valeur nutritive des protéines. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **12** (2), 1-94.

Adrian S., 1959. Bilan nutritif de la transformation du sorgho en bière. *Ann. Nutrit. Aliment.* **13**, 1

Adrian S., 1960. Le dosage des acides aminés par voie microbiologique. *Aminoacides, peptides, pro téines*, n° 4, A. E. C., Société de Chimie industrielle, Paris, 121-140.

Barnes H., 1966. Amino acid analysis of some marine invertebrate tissues. in : Techniques in amin acid analysis, 82. *Technicon Monograph*, n° 1.

Bizeau C., 1963. Étude des facteurs limitant la croissance des levures dans les moûts de « Clairette » et de « Muscat blanc à petits grains ». *Ann. Technol. agric.*, **12** (4), 247-276.

Block R., Weiss K., 1956. *Amino acid Handbook*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, Ed., 450-470

Boulter D., 1966. An introduction to automatic amino acid analysis with plant extracts. in : Tech niques in amino acid analysis,. *Technicon Monograph.*, n° 1, 93.

Bourdet A., Herard J., 1958. Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 177-200.

CASES ., 1959. *Essai de sélection de levures pour un vin mousseux naturel.* Thèse Fac. Sci. Toulouse.

CASTOR J. G. B., 1953. The free amino acids of musts and wines. I. Microbiological estimation of fourteen amino acids in California grape must. *Food Res.*, **18**, 139.

DUPUY P., MORFAUX J. N., USCIATI Madeleine, 1967. Métabolisme azoté des levures en œnologie. (Fermentations et vinifications). 2e *Symposium international d'Œnologie.* Bordeaux-Cognc. 13-17 Juin 1967, **1**, 107-123

GENEVOIS L., 1964. Dosage des aminoacides dans le vin. *Méth. anal. Offic. internation. Vigne Vin*, (feuillets verts), n° 157.

HENNIG K., 1943. Bilans de l'azote dans les moûts et les vins nouveaux en fermentation. *Bull. Offic. internation. Vigne Vin*, **16** (159), 82-86.

KURT RANDERATH, 1963. *Thin layer chromatography*, 93-98, Edit. Academic Press, New York and London.

KIRARA H., SNELL E., 1952. Peptides and bacterial growth. II. L-alanine peptides and growth of *Lactobacillus casei*. *J. biol. Chem.*, **197**, 791-800.

KIRARA H., KLATT O., SNELL E., 1952. Peptides and bacterial growth. III. Utilisation of tyrosine and tyrosine peptides by *Streptococcus faecalis*. *J. biol. Chem.*, **197**, 801-807.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1959. Dosage microbiologique des acides aminés des moûts de raisin et des vins. *Vitis*, Mars, 45-56.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1961. Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 143-160.

MORFAUX J. N., DUPUY P., 1966. Comparaison de l'exsorption des acides aminés par une souche de *Saccharomyces cerevisiae* et un mutant résistant à la canavanine. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, Série D, 1224.

PETERS V. J., SNELL E., 1954. Peptides and bacterial growth. VI. The nutritional requirements of *Lactobacillus delbrueckii*. *J. Bacteriol.*, **67**, 69-76.

PEYNAUD E., 1950. Analyses complètes de 8 vins doux naturels. *Ann. agron.*, 382-388.

POUX C., 1968. Composés azotés dans les vins de goutte, vins de presse et vins de lies. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 315-332.

SCHOFFENIELDS E., 1967. La désamination, la désamidation, la transamination. Entrée de l'azote dans les composés organiques. in : JAVILLIER M., POLONOVSKI M., FLORKIN M., BOULANGER D., LEMOIGNE M., ROCHE J., WURMSER R., *Traité de Biochimie générale*, **3**, fasc. 1, 372. Masson et Cie, Paris., Édit.

SNELL E., 1957. Microbiological determination of amino acid. in : *Methods in enzymology*, **3**, 477. Academic Press, Éd.

STEELE F., SAUBERLICH H. E., REYNOLDS M. S., BAUMANN C. A., 1948. *Media for* Leuconostoc mesenteroides *P. 60 and* Leuconostoc citrovorum *8081.* From the Departments of Biochimistry and home economics, College of Agriculture University of Wisconsin Madison.

STOKES J. L., GUNNESS M., 1945. Pyridoxamine and the synthesis of aminoacids by lactobacilli. *Sciences*, **101**, 43-44.

TECHNICON, 26, rue Vignon, Paris (9e).

TERCELJ D., 1965. Étude des composés du vin. *Ann. Technol. agric.*, **14**, (4), 307-309.

TRISTRAM G. R., 1966. Preparation of hydrolysates. in : Techniques in amino acid analysis. *Technicon Monograph*, n° 1, 61.

WEISS H., ROUSSET A., MAILLARD M.-T., BONNET R., 1960. L'évolution qualitative et semi-quantitative des acides aminés au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 1322.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (3), 239-260.

ÉTUDE DANS UN MILIEU PEU HYDRATÉ, LE BLÉ, DU RÔLE DE L'EAU DANS LE MÉCANISME DE DÉNATURATION THERMIQUE DE CERTAINES PROTÉINES ENZYMATIQUES (1)

J.-L. MULTON et A. GUILBOT

avec la collaboration technique de Henriette DROUET, G. BRYON, G. MARTIN et E. POPULUS

Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés,
C. E. R. D. I. A., 91 - Massy
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Deux critères — l'activité de la ribonucléase extractible et le temps moyen de germination — ont permis de suivre la dénaturation des protéines du blé au cours de chocs thermiques effectués à teneur en eau constante.

Trois paramètres dépendants ont été pris en considération — la température, la teneur en eau et la durée — ce qui a permis de dégager les lois de corrélation qui existent entre eux.

L'analyse cinétique et thermodynamique des résultats obtenus a permis de montrer :

— que la réaction de dénaturation comporte deux phases successives du 1er ordre ;

— que l'eau joue le rôle d'un catalyseur, rôle beaucoup plus accentué au cours de la 1re phase qui correspond à une redistribution des énergies de liaisons de l'eau dans la substance ;

— qu'il existe une relation linéaire unique entre les variations ΔS^* et ΔH^*, toutes choses égales par ailleurs, permettant d'assimiler la dénaturation à une transition allotropique.

Ces résultats ont permis de formuler une hypothèse générale sur le rôle de l'eau dans la dénaturation en milieu solide.

Les applications que l'on peut escompter sur le plan pratique sont enfin indiquées.

I. — INTRODUCTION

Parmi les traitements technologiques les plus couramment utilisés dans les industries alimentaires, beaucoup sont caractérisés par une élévation de la température, dangereuse du fait qu'ils sont appliqués à une substance riche en protéines bien que relativement peu hydratée. C'est le cas, par exemple, dans les opérations de séchage, de cuisson ou de stérilisation de produits solides ou pâteux.

(1) Ce travail a fait l'objet de thèses de Doctorat d'État ès Sciences appliquées soutenues le 15-12-1969 à la Faculté des Sciences de Paris (n° d'enregistrement au C. N. R. S. : Ao 3800) par J.-L. MULTON.

Ce problème est particulièrement aigu dans le domaine qui nous est familier, celui du séchage des céréales et du blé en particulier ; en effet les conditions économiques récentes rendent cette pratique de plus en plus fréquente et intensive (MULTON *et al.*, 1969).

Le traitement thermique provoque une dénaturation plus ou moins prononcée des protéines du blé, ayant pour corollaire la perte de certaines activités biologiques (HUTCHINSON et BOOTH, 1946 : BAUTISTA et LINKO, 1962), la modification des propriétés physico-chimiques (Mac GUIRE, 1958 ; HARRISON *et al.*, 1969) et l'altération des propriétés rhéologiques du gluten (BELDEROCK, 1963). Il convient d'ailleurs de souligner combien la présence de grains chauffés, même en faible quantité, dans un lot de blé, peut être préjudiciable à sa valeur boulangère.

Aussi, dans le cas précis du blé, l'étude du rôle de l'eau dans les mécanismes de la dénaturation des protéines en milieu solide nous a-t-elle semblé particulièrement intéressante à entreprendre, car elle doit permettre sur le plan pratique, d'une part de dégager des tests sensibles de l'altération, d'autre part d'améliorer les techniques de séchage et par conséquent d'améliorer la qualité du produit fini.

L'étude de la dénaturation des protéines en milieu solide n'a d'ailleurs fait l'objet, à ce jour, que d'un nombre très restreint de travaux, la majorité des recherches portant sur les protéines en solution.

Cependant plusieurs auteurs, en particulier HUTCHINSON (1944), HUTCHINSON et BOOTH (1946), ont mis en évidence des corrélations existant entre la température, la teneur en eau du produit et la durée du choc thermique qu'il subit ; de plus quelques essais d'interprétation cinétique et thermodynamique ont été avancés, en particulier dans le cas du blé, par PENCE *et al.* (1953) et par BECKER et SALLANS (1956). Le rôle que l'eau peut jouer dans le mécanisme de dénaturation est très mal connu,

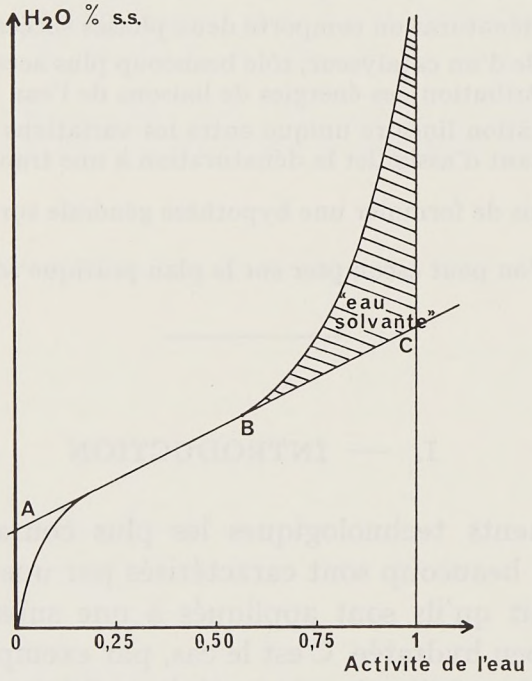


FIG. 1. — *Représentation schématique d'une courbe de sorption*

A = Point correspondant à la quantité d'eau fortement fixée ;
B = Point d'apparition de l'eau « solvante » ;
C = Point correspondant à la quantité d'eau totale non « solvante ».

même en solution (POLLARD, 1964 ; TANFORD, 1970) ; ainsi que le souligne PRIVALOV (1966, 1967, 1968), ce rôle semble lié aux interactions structurales de l'eau et de la protéine native, que KLOTZ (1958), KAUZMANN (1959) et SCHERAGA (1963, 1965) décrivent de façon parfois contradictoire.

Un des moyens classiques d'aborder l'étude de l'état de l'eau dans une substance est d'établir la courbe de sorption (fig. 1) qui exprime, à l'équilibre, la teneur en eau du produit en fonction de l'humidité relative (H. R.) de l'atmosphère qui l'entoure. Ainsi que l'ont montré GUILBOT et LINDENBERG (1960), il est possible de déterminer sur cette courbe la fraction d'eau solvante présente dans le milieu ; cette fraction par sa mobilité autorise ou favorise un certain nombre de réactions biochimiques et biologiques.

Dans la première partie de ce mémoire nous décrivons les conditions expérimentales que nous avons mises au point pour réaliser cette étude, puis, dans la deuxième partie, nous donnons l'interprétation des résultats obtenus, ce qui nous conduit finalement à dégager une hypothèse sur le rôle de l'eau dans la dénaturation thermique des protéines.

II. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Le travail expérimental a consisté à soumettre du blé entier et vivant à des chocs thermiques effectués à teneur en eau constante, en ne faisant varier dans chaque cas qu'un seul des trois paramètres : teneur en eau — température ou durée du traitement thermique ; puis à apprécier l'état de dénaturation des protéines.

A. — *Le choix des conditions expérimentales*

Afin de pouvoir suivre et caractériser la dénaturation, nous avons choisi deux critères différents :

— d'une part, un critère traduisant un *aspect particulier* des phénomènes : c'est l'inactivation d'une enzyme, la ribonucléase (RNase) extractible du blé, signalée par BOOTH (1948) comme étant particulièrement thermosensible ; ce critère permet de suivre la dénaturation d'une protéine déterminée, sous l'effet d'un choc thermique subi, *in situ*, dans son milieu naturel ;

— d'autre part, un critère traduisant l'*aspect global* des phénomènes : c'est la mesure du temps moyen de germination (T_m) qui permet d'apprécier le taux de viabilité du grain. Cette mesure intègre entre autres les altérations thermiques des constituants biologiquement actifs du caryopse de blé, en particulier des composants protidiques constituant les équipements enzymatiques et hormonaux.

Par ailleurs, afin de confirmer les résultats obtenus et de les généraliser au cas d'une protéine purifiée, des chocs thermiques ont été effectués dans des conditions similaires à celles définies pour le blé, sur la RNase pancréatique solide.

L'analyse précise des conditions dans lesquelles le choc thermique est effectué est nécessaire pour permettre l'interprétation des résultats obtenus. Il s'est donc avéré indispensable de déterminer la cinétique thermique subie par l'échantillon ainsi que l'évolution de la pression et de l'H. R. E. (Humidité Relative d'Équilibre) dans l'enceinte de choc thermique, ainsi que celle de la teneur en eau des grains aux différents stades du traitement.

B. — *Méthodes mises au point*

En dehors de l'utilisation d'un certain nombre de méthodes classiques que nous ne décrirons pas ici, la réalisation de cette étude a nécessité la mise au point de trois méthodes : deux permettent d'apprécier l'état de dénaturation, selon les critères précédemment définis ; la troisième concerne les mesures de sorption.

1° La détermination du temps moyen de germination (T_m) (MULTON *et al.*, 1967, 1968), consiste à suivre, par un enregistrement photographique horaire, l'évolution du nombre de grains germés en fonction du temps. L'appareil mis au point permet de suivre simultanément la germination de 15 échantillons de 100 grains pendant 1 à 2 semaines, à une température constante. Les germoirs comportent un dispositif d'alimentation continue en eau qui permet de régler la vitesse et le potentiel capillaire d'imbibition.

La lecture des films permet ensuite d'établir la distribution de fréquence des durées de germination de chaque lot et d'en calculer la moyenne (T_m). Ce critère s'est révélé plus sensible et plus reproductible que ceux correspondant au pouvoir germinatif et à l'énergie germinative.

2° Pour le dosage de l'activité RNasique, une méthode classique a été adaptée au cas des céréales (MULTON, 1969). Elle consiste, après extraction de l'enzyme, à en effectuer d'abord la purification partielle par précipitation fractionnée, puis à mesurer son activité par dosage spectrophotométrique des oligonucléotides acido-solubles résultant de son action sur une solution d'ARN (1).

3° L'étude des courbes de sorption, et le conditionnement de la ribonucléase pancréatique, ont nécessité l'élaboration d'une méthode permettant d'établir rapidement et simultanément l'équilibre de sorption de vapeur d'eau de douze échantillons (MULTON et GUILBOT, 1967).

On réalise l'équilibre hydrique des produits en les plaçant dans une étuve multicellulaire isotherme de grande inertie thermique dont l'hygrométrie est réglée à l'aide d'un dispositif de conditionnement d'air, par saturation sous pression suivie d'une détente isotherme jusqu'à la pression atmosphérique. L'humidité relative est contrôlée à l'aide d'un hygromètre électronique à point de rosée.

C. — *Description et étude critique du protocole expérimental*

1. *Description.*

La figure 2 résume dans le cas du blé les principales étapes du protocole expérimental, réparties sur un mois environ :

— tout d'abord, le blé subit un pré-conditionnement pour l'amener à la teneur en eau voulue pour l'essai, soit par séchage très ménagé, soit par humidification ;

— puis le blé est divisé, après dosage d'eau, en douze échantillons ;

— onze d'entre eux sont placés dans un récipient métallique étanche et subissent pendant une durée déterminée un choc thermique par plongée du récipient dans un bain thermostaté ;

— après refroidissement les échantillons sont séchés ou humidifiés jusqu'à une teneur en eau standard de 14 p. 100 ; l'échantillon témoin ne subit pas de choc thermique, mais se trouve soumis aux mêmes conditionnements successifs que les autres ;

— enfin, une partie aliquote de chacun des 12 échantillons est disposée sur l'appareil de germination afin de mesurer le temps moyen de germination ; l'autre partie est broyée afin de doser l'activité ribonucléasique.

Dans le cas de la ribonucléase pancréatique solide, on utilise des petits récipients permettant de disposer 1,5 mg de matière ; les conditionnements sont effectués dans l'étuve multicellulaire à air conditionné et la mesure de l'humidité relative permet de connaître indirectement, grâce à la courbe de sorption, la teneur en eau des échantillons de RNase, dont la faible quantité ne permet pas un dosage direct.

2. *Étude critique.*

a) Notre premier souci a été de vérifier que la teneur en eau demeure bien constante pendant le choc thermique.

Déjà les dosages d'eau effectués avant et après le traitement, et montrant des différences non significatives, fournissent une réponse positive ; de plus un calcul simple montre que la quantité maximale d'eau que l'air de l'enceinte peut absorber à saturation est négligeable, inférieure à 1 p. 100, par rapport à l'eau totale contenue dans les grains. Cependant, pour plus de

(1) Acide ribonucléique de levure (Laboratoires Choay).

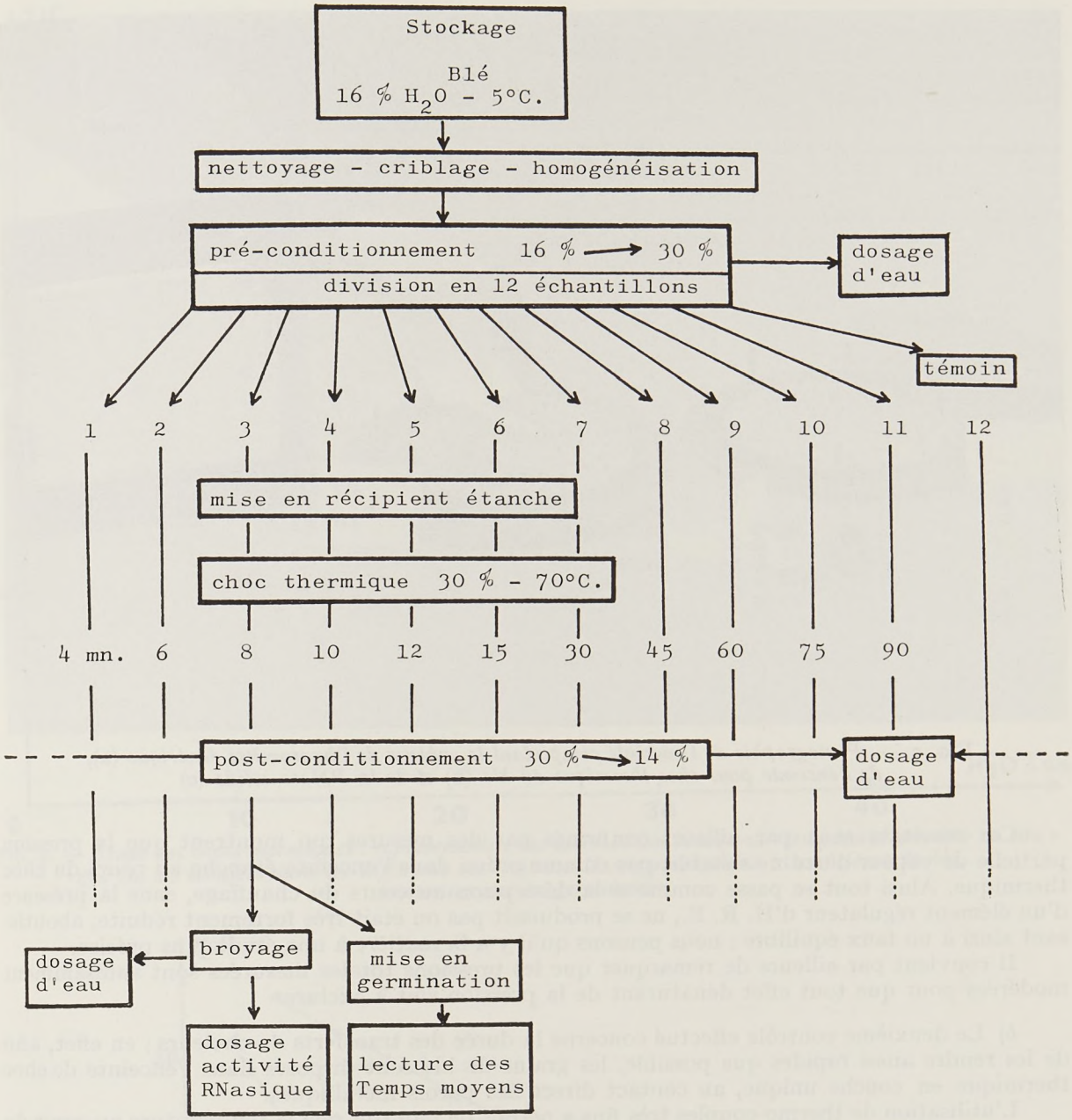


SCHÉMA DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DANS LE CAS DU BLÉ, POUR UN CHOC THERMIQUE EFFECTUÉ A 70°C, SUR DU BLÉ A 30 % D'HYDRATATION.

FIG. 2. — *Organigramme schématique d'une expérience de choc thermique à teneur en eau constante sur un lot de blé, montrant la répartition des opérations sur un mois*

précision, nous avons suivi expérimentalement les échanges de vapeur d'eau entre les grains et l'atmosphère, à l'aide d'un hygromètre électrique dont la sonde sensible est suffisamment petite pour être disposée dans une enceinte de choc thermique ; la figure 3 présente une vue de ce dispositif.

Il apparaît que l'humidité relative atteinte une fois l'équilibre réalisé est inférieure à celle que l'on pouvait déterminer à partir des isothermes de désorption du blé et que la quantité d'eau cédée par les grains à l'atmosphère est notablement inférieure à la valeur maximale donnée par le calcul ; la même observation est faite avec une enceinte maintenue à pression atmosphérique par un ajutage très fin.

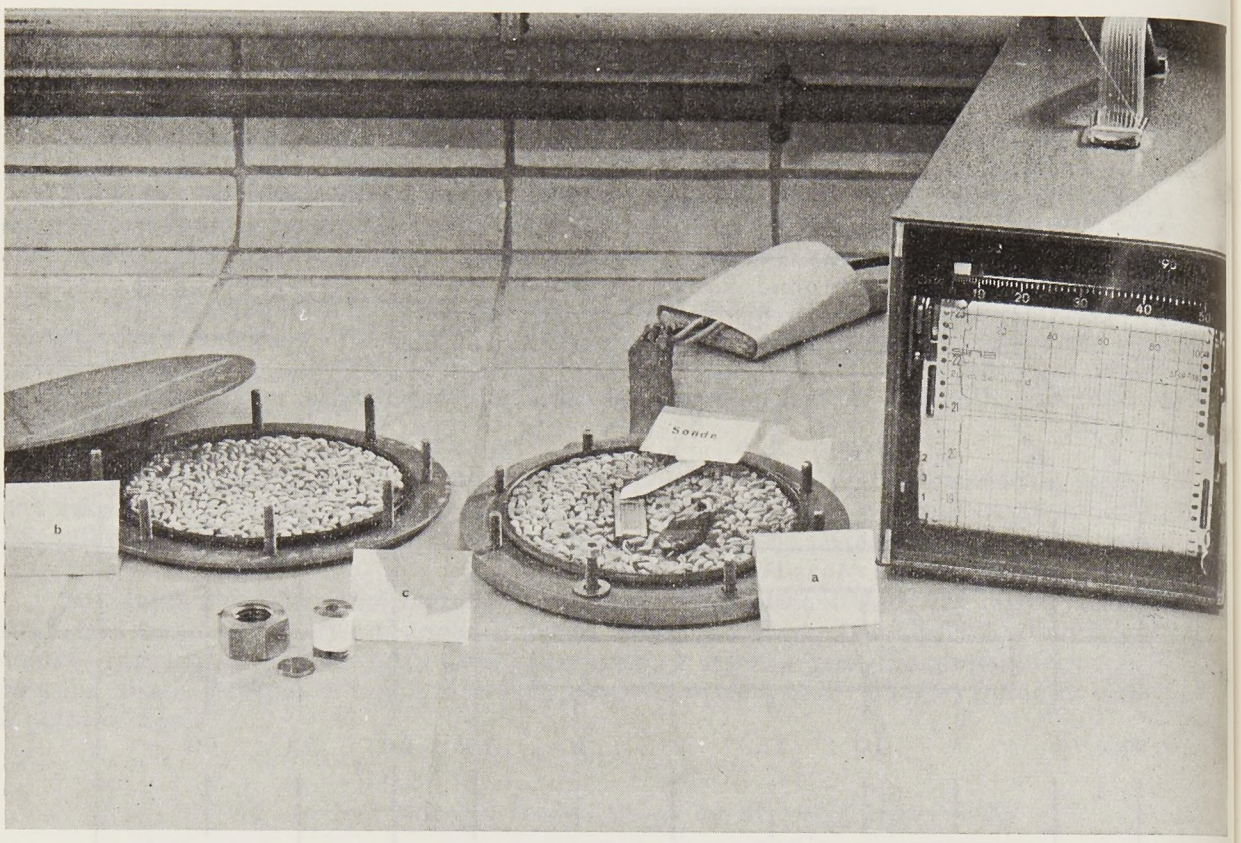


FIG. 3. — *Photographie de l'enceinte comportant le capteur de l'hygromètre électrique* (a), *de l'enceinte pour choc thermique du blé* (b) *et de la RNase solide* (c)

Ces résultats sont par ailleurs confirmés par des mesures qui montrent que la pression partielle de vapeur d'eau ne s'établit pas comme prévu dans l'enceinte étanche au cours du choc thermique. Ainsi tout se passe comme si la désorption au cours du chauffage, sans la présence d'un élément régulateur d'H. R. E., ne se produisait pas ou était très fortement réduite, aboutissant ainsi à un faux équilibre ; nous pensons qu'il y a là matière à une étude plus précise.

Il convient par ailleurs de remarquer que les pressions totales mesurées sont suffisamment modérées pour que tout effet dénaturant de la pression soit à exclure.

b) Le deuxième contrôle effectué concerne la durée des transferts de chaleurs ; en effet, afin de les rendre aussi rapides que possible, les grains de blé sont disposés dans l'enceinte de choc thermique en couche unique, au contact direct des parois métalliques.

L'utilisation de thermo-couples très fins a permis de montrer que la température au cœur du grain est en équilibre avec celle du bain après deux à trois minutes au plus, tant au chauffage qu'au refroidissement.

c) Enfin, il était nécessaire d'apprécier l'influence des conditionnements successifs, humidification ou séchage, sur la réponse des critères de dénaturation.

Il s'est avéré que l'activité ribonucléasique ainsi que le temps moyen de germination peuvent être légèrement affectés par les conditionnements ; aussi chaque essai doit comporter un échantillon témoin subissant seulement les conditionnements et par rapport auquel sont exprimés les résultats obtenus au cours des chocs thermiques. L'activité de la ribonucléase pancréatique, par contre, est insensible aux conditionnements.

III. — DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS

Sur la figure 4, chaque point représente une combinaison « teneur en eau-température » étudiée ; pour chacune d'entre elles, les effets de 6 à 12 chocs thermiques de durées croissantes, allant de 2 minutes à 6 heures, ont été examinés.

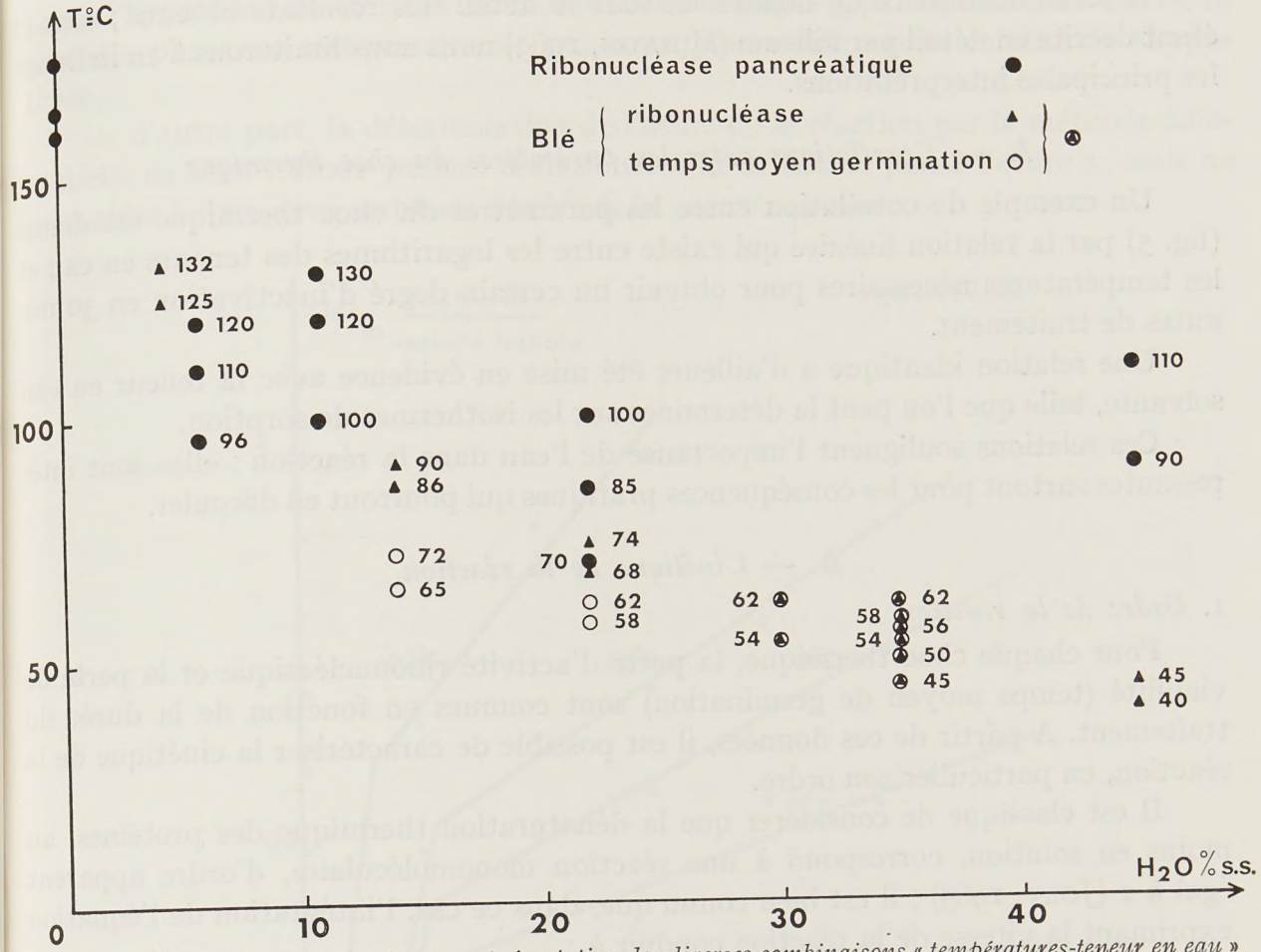


FIG. 4. — *Étude des chocs thermiques : représentation des diverses combinaisons « températures-teneur en eau » qui ont été étudiées dans les différents cas : ribonucléase pancréatique, ribonucléase du blé, temps moyen de germination*

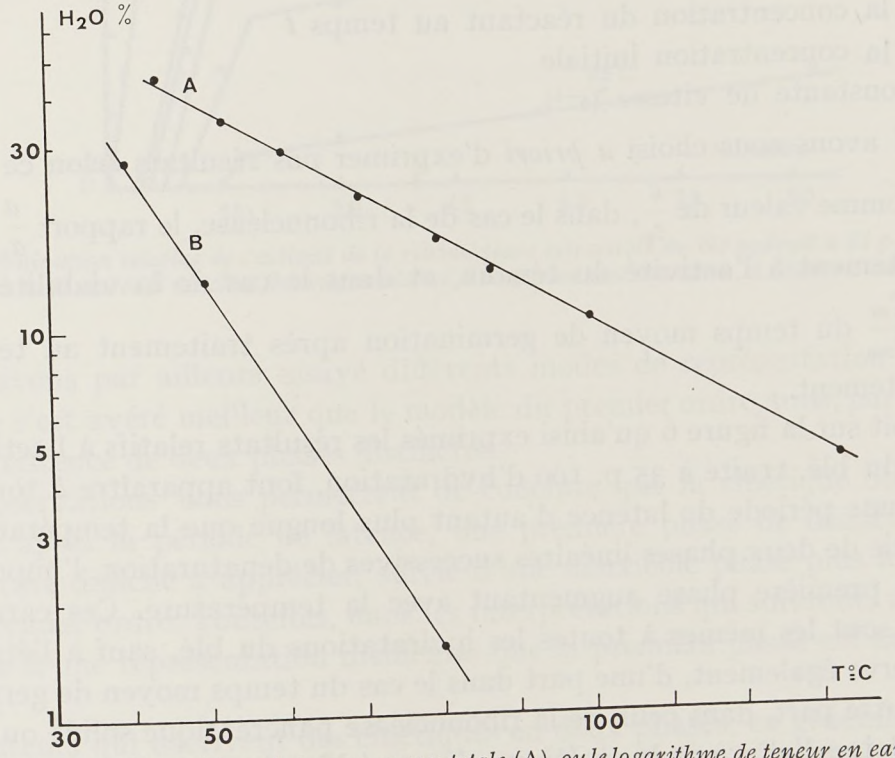


FIG. 5. — *Relation entre le logarithme de teneur en eau totale* (A), *ou le logarithme de teneur en eau solvante* (*B*), *et la température correspondant à un taux d'inactivation de 50 p. 100 de la RNase extractible du blé, après un choc thermique de 30 minutes.*

Il serait fastidieux de donner ici tout le détail des résultats obtenus ; ceux-ci étant décrits en détail par ailleurs (MULTON, 1969) nous nous limiterons à en indiquer les principales interprétations.

A. — *Corrélations entre les paramètres du choc thermique*

Un exemple de corrélation entre les paramètres du choc thermique est donné (fig. 5) par la relation linéaire qui existe entre les logarithmes des teneurs en eau et les températures nécessaires pour obtenir un certain degré d'inactivation en 30 minutes de traitement.

Une relation identique a d'ailleurs été mise en évidence avec la teneur en eau solvante, telle que l'on peut la déterminer sur les isothermes de sorption.

Ces relations soulignent l'importance de l'eau dans la réaction ; elles sont intéressantes surtout pour les conséquences pratiques qui pourront en découler.

B. — *Cinétique de la réaction*

1. *Ordre de la réaction.*

Pour chaque choc thermique, la perte d'activité ribonucléasique et la perte de viabilité (temps moyen de germination) sont connues en fonction de la durée du traitement. A partir de ces données, il est possible de caractériser la cinétique de la réaction, en particulier son ordre.

Il est classique de considérer que la dénaturation thermique des protéines, au moins en solution, correspond à une réaction monomoléculaire, d'ordre apparent égal à 1 (JOLY, 1965) ; il est bien connu que, dans ce cas, l'intégration de l'équation exprimant la vitesse de la réaction conduit à :

$$\text{Log}\,\frac{c}{c_0} = kt$$

où c est la concentration du réactant au temps t

c_0 est la concentration initiale

k la constante de vitesse (s^{-1}).

Aussi avons-nous choisi *a priori* d'exprimer nos résultats selon ce système, en prenant comme valeur de $\frac{c}{c_0}$, dans le cas de la ribonucléase, le rapport $\frac{a}{a_0}$ de l'activité après traitement à l'activité du témoin, et dans le cas de la viabilité du grain le rapport $\frac{T_m}{T_{m0}}$ du temps moyen de germination après traitement au temps moyen avant traitement.

On voit sur la figure 6 qu'ainsi exprimés les résultats relatifs à l'activité ribonucléasique du blé, traité à 35 p. 100 d'hydratation, font apparaître à toutes les températures une période de latence d'autant plus longue que la température est plus basse, suivie de deux phases linéaires successives de dénaturation, l'importance relative de la première phase augmentant avec la température. Ces caractéristiques cinétiques sont les mêmes à toutes les hydratations du blé, sauf à l'état anhydre ; on les observe également, d'une part dans le cas du temps moyen de germination du blé et, d'autre part, dans celui de la ribonucléase pancréatique solide ou en solution. Afin de préciser l'allure de la cinétique, deux vérifications ont été faites :

— d'une part, un test statistique de linéarité nous a montré que pour la deuxième

phase l'hypothèse de linéarité est admissible au risque 5 p. 100 ; dans le cas de la première phase, ce test manque de puissance pour confirmer la validité de l'hypothèse ;

— d'autre part, la détermination de l'ordre de la réaction par la méthode différentielle de VAN'T HOFF permet d'attribuer à la deuxième phase l'ordre 1, mais ne peut aider à fixer avec certitude l'ordre de la première phase.

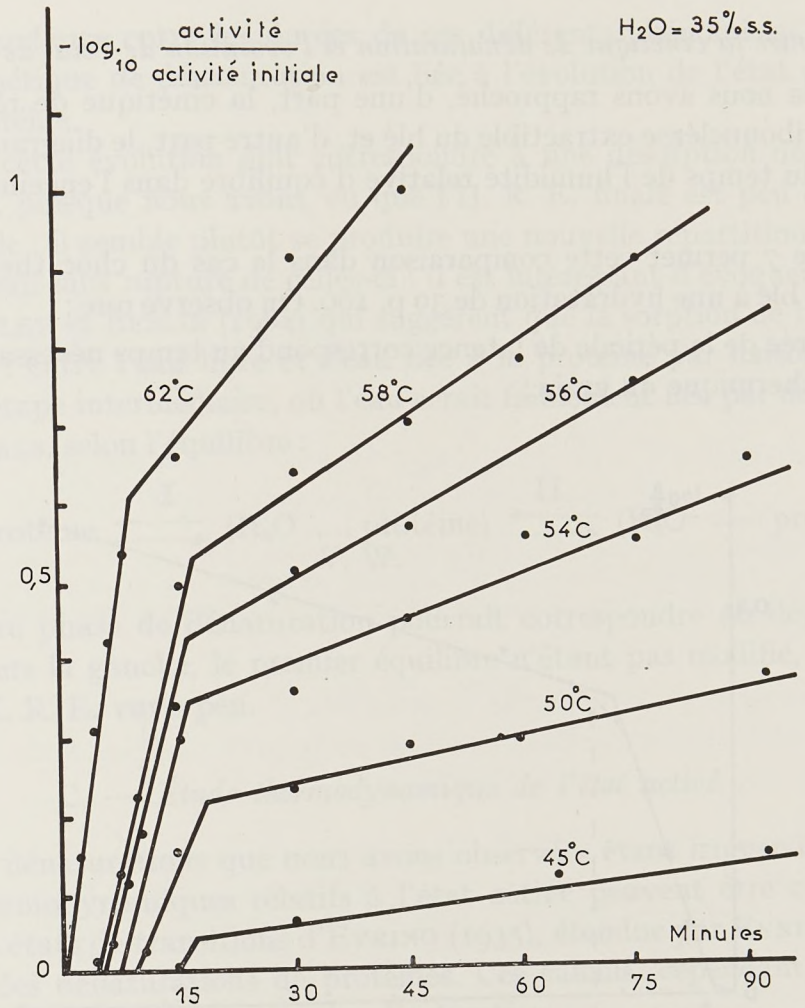


FIG. 6. — *Diminution relative de l'activité de la ribonucléase extractible du blé hydraté à 35 p. 100* (S. S.) *en fonction de la durée d'un choc thermique réalisé à teneur en eau constante, à diverses températures*

Nous avons par ailleurs essayé différents modes de représentation graphique; si aucun ne s'est avéré meilleur que le modèle du premier ordre, tous, par contre, ont souligné l'existence de deux phases distinctes.

Ces observations nous permettent de conclure que la cinétique observée présente bien, après la période de latence, une première phase de dénaturation très rapide, d'ordre difficile à apprécier, suivie d'une deuxième phase plus lente strictement du premier ordre. Toutefois, dans les interprétations qui suivront, nous admettrons, faute d'une représentation meilleure, que la première phase est aussi du premier ordre.

Les auteurs qui décrivent des cinétiques en deux phases, en général considérées comme étant du premier ordre, montrent de grandes divergences dans les explications qu'ils en donnent : certains considèrent que la substance dénaturée comporte

plusieurs éléments distincts se dénaturant à des vitesses différentes (PENCE *et al.* 1953 ; BACHRACH, 1957 ; CARTWRIGHT et LAUFFER, 1958 ; KAPLAN, 1958) ; d'autres pensent qu'il intervient deux réactions ou deux mécanismes réactionnels successifs (HIATT, 1960 ; LICCIARDELLO, 1967 ; KOMEMUSHI, 1966).

Aussi nous a-t-il semblé intéressant de rechercher l'explication de la présence de ces deux phases qui, très rapidement, nous était apparue comme devant être liée à l'état de l'eau dans la protéine.

2. Relation entre la cinétique de dénaturation et l'évolution de l'état de liaison de l'eau

Pour cela nous avons rapproché, d'une part, la cinétique de réaction d'inactivation de la ribonucléase extractible du blé et, d'autre part, le diagramme d'évolution en fonction du temps de l'humidité relative d'équilibre dans l'enceinte de choc thermique.

La figure 7 permet cette comparaison dans le cas du choc thermique effectué à 62°C sur du blé à une hydratation de 30 p. 100. On observe que :

— la durée de la période de latence correspond au temps nécessaire pour la mise en équilibre thermique du grain ;

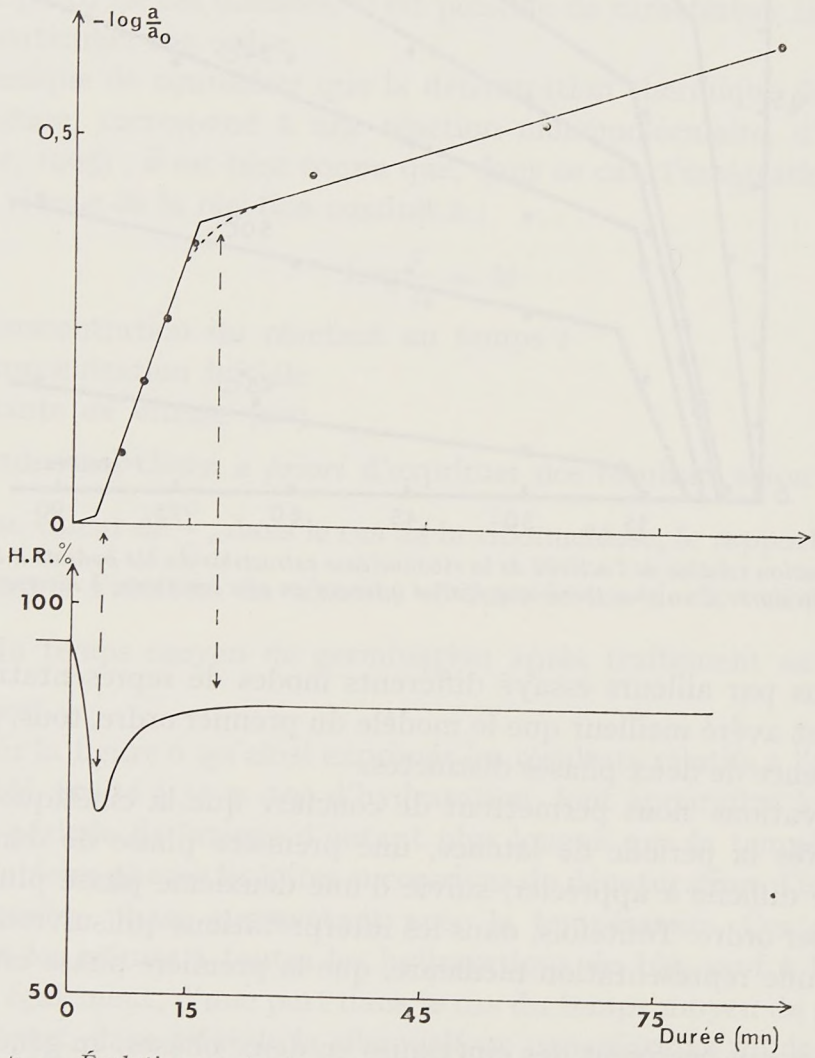


FIG. 7. — *Évolution comparée, en fonction de la durée du traitement thermique, de l'activité RNasique résiduelle du blé et de son H. R. E. enregistrée à l'aide d'un hygromètre électrique*
(Choc thermique réalisé à 62°C, sur du blé hydraté à 30 p. 100)

— la première phase commence au moment où se manifeste la remontée de l'H. R. E. par désorption de la vapeur d'eau du grain sous l'effet de la chaleur. La durée est du même ordre de grandeur que le temps pendant lequel on observe cette augmentation de l'H. R. E., ce qui correspond en fait à une variation de l'état de liaison de l'eau ;

— la deuxième phase de dénaturation commence quand l'équilibre hydrique est atteint.

La correspondance entre les durées de ces différents phénomènes montre que l'allure de la cinétique de dénaturation est liée à l'évolution de l'état de liaison de l'eau dans la protéine.

Cependant cette évolution doit correspondre à une désorption de l'eau extrêmement limitée, puisque nous avons vu que l'H. R. E. finale est peu différente de l'H. R. E. initiale ; il semble plutôt se produire une nouvelle répartition des énergies de liaison de l'eau sans rupture de celles-ci : il est intéressant d'évoquer à ce propos l'hypothèse d'Eley et Leslie (1964) qui suggèrent que la sorption de l'eau se ferait en deux étapes ; entre l'eau libre et l'eau liée à la protéine par liaison hydrogène, il y aurait une étape intermédiaire, où l'eau serait faiblement liée par des attractions de Van der Waals, selon l'équilibre :

$$H_2O + \text{protéine} \underset{}{\overset{I}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{V. W.}}{(H_2O \text{ ..... protéine})} \overset{II}{\rightleftharpoons} (H_2O^+ \text{ ----- protéine}^-)$$

La première phase de dénaturation pourrait correspondre au déplacement de l'équilibre II vers la gauche, le premier équilibre n'étant pas modifié, ce qui expliquerait que l'H. R. E. varie peu.

C. — *Étude thermodynamique de l'état activé*

Toutes les dénaturations que nous avons observées étant irréversibles, seuls les paramètres thermodynamiques relatifs à l'état activé peuvent être calculés, grâce à la théorie des états de transitions d'Eyring (1935), étendue par Eyring et Stearn (1939) au cas des dénaturations de protéines. Ces calculs, cependant, exigent que l'on détermine au préalable les énergies d'activation.

1. *Énergie d'activation.*

L'énergie d'activation E de la réaction se détermine graphiquement pour chaque teneur en eau grâce à la relation d'Arrhenius :

$$\text{Log } k = \text{Log A} - \frac{E}{RT} \text{ en portant Log } k \text{ en fonction de } \frac{1}{T}$$

A est une constante

R la constante des gaz parfaits (1,987 cal/mole · °K)

T la température absolue

k, constante de vitesse, est déterminée graphiquement, pour chaque phase, sur les courbes cinétiques.

La figure 8 montre l'évolution de l'énergie d'activation relative à la deuxième phase de réaction, en fonction de la teneur en eau du milieu au moment du traitement

thermique, respectivement dans le cas du blé (temps moyen de germination : A activité RNasique : B) et dans celui de la RNase pancréatique (C). On observe que dans tous les cas l'énergie d'activation passe par une valeur minimale pour une teneur en eau de 22 p. 100.

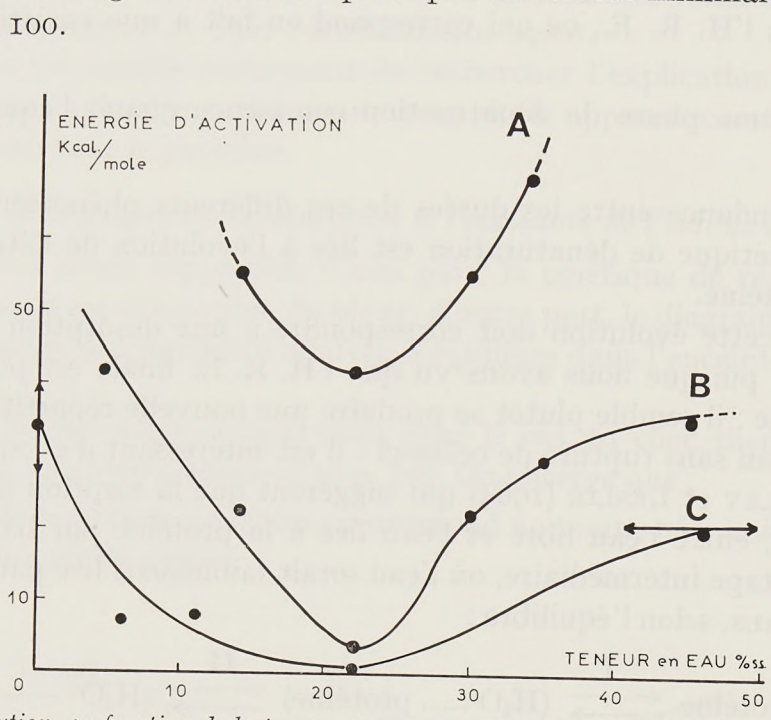


FIG. 8. — *Évolution, en fonction de la teneur en eau, au cours d'un choc thermique en milieu solide, de l'énergie d'activation relative à la 2e phase de la réaction dans le cas du blé (temps moyen de germination (A), RNase extractible (B)) et dans le cas de la RNase pancréatique (C).*

La forte valeur de la pente de la première phase rendant sa mesure imprécise le calcul de l'énergie d'activation relative à cette première phase n'a pu être fait que dans quelques cas présentés sur le tableau I.

TABLEAU I

Énergies d'activation (kcal/mole) relatives à la première et à la deuxième phase de la réaction de dénaturation thermique de la ribonucléase de blé

Teneur en eau p. 100	Activité RNasique extractible du blé		Temps moyen de germination	
	1re phase	2e	1re	2e
30	11,6	21,9	—	—
35	17,7	30,0	40,5	64,5

On constate que l'énergie d'activation relative à la deuxième phase est nettement plus élevée que celle correspondant à la première : près du double.

Ces observations, concordant avec les résultats de PENCE *et al.* (1963), de BECKER et SALLANS (1956) et de SISLER et JOHNSON (1965), entre autres, conduisent à penser que l'eau joue dans la dénaturation le rôle d'un catalyseur en abaissant le niveau de

la barrière d'énergie que doit franchir la molécule pour être activée. Il apparaît que l'effet catalytique est le plus intense au cours de la première phase, celle où il y a remaniement de l'état de l'eau, et que cet effet catalytique est fonction de la teneur en eau, passant par un maximum vers 22 p. 100 d'hydratation, au moins au cours de la deuxième phase.

2. *Paramètres thermodynamiques de l'état activé.*

Les valeurs de l'énergie d'activation permettent, ainsi que nous l'avons dit, de calculer les paramètres thermodynamiques de l'état activé.

En effet, on sait qu'EYRING (1935) a établi la relation suivante :

$$k = \frac{bT}{h} K^* \qquad (1)$$

où k est la constante de vitesse, K* la constante d'équilibre de formation du complexe activité (toutes les valeurs affectées du signe (*) étant relatives au complexe activé), b la constante de BOLTZMANN ($1{,}38 \cdot 10^{-16}$ erg/°C) et h la constante de PLANCK ($6{,}62 \cdot 10^{-27}$ erg·s).

On montre facilement que l'énergie d'activation E d'ARRHENIUS est sensiblement égale à la variation d'enthalpie au facteur RT près :

$$E = \Delta H^* - RT \qquad (2)$$

Grâce aux relations précédentes, on montre que :

$$\Delta F^* = RT \operatorname{Log} \frac{bT}{kh} \qquad (3)$$

$$\text{et } \Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta F^*}{T} \qquad (4)$$

Les relations (2), (3) et (4) permettent de calculer tous les paramètres thermodynamiques de l'état activé, connaissant expérimentalement E, T et k.

Le tableau 2 donne un exemple des résultats obtenus dans le cas de la RNase extractible du blé. On peut faire les observations suivantes, qui sont également valables dans tous les autres cas étudiés (temps moyen de germination du blé, RNase pancréatique solide et en solution) :

a) la variation d'énergie libre ΔF* demeure sensiblement constante, avec des valeurs comprises entre 23,6 et 31,0 kcal/mole, quelles que soient la teneur en eau, la température, la phase, la méthode d'appréciation de la dénaturation.

Ceci est en plein accord avec les études de STEARN (1938, 1949) qui souligne longuement ce fait. On peut penser que cela traduit la rupture d'un même type de liaison, la liaison hydrogène en l'occurrence.

b) le facteur RT étant négligeable devant E, l'enthalpie ΔH* varie comme l'énergie d'activation.

c) les variations d'entropie ΔS* relatives à l'activation sont, en valeur absolue, relativement faibles par rapport à celles concernant l'ensemble de la réaction de dénaturation ; ces dernières, inaccessibles dans les réactions irréversibles étudiées, ont pu être établies dans quelques cas particuliers (KUNITZ, 1948).

TABLEAU 2

Dénaturation de la RNase extractible du blé. Paramètres thermodynamiques de l'état activé correspondant à la deuxième phase de la réaction

Teneur en eau p. 100 S. S.	Température °C	Température °K	$k \cdot 10^{+2}$ s^{-1}	Énergie libre ΔF* cal/mole	Enthalpie ΔH* cal/mole	Entropie ΔS* cal/mole · °K
4,5	125	398	0,0088	31 077	41 106	+ 25,17
	132	405	0,0220	30 897	41 092	+ 25,15
14	86	359	0,0279	27 129	21 822	— 19,38
	90	363	0,0395	27 189	21 814	— 19,40
22	68	341	0,0192	25 990	2 998	— 72,03
	74	347	0,0215	26 382	2 986	— 72,03
30	54	327	0,0067	25 583	21 276	— 13,17
	62	335	0,0120	25 837	21 260	— 13,66
35	45	318	0,0042	25 158	28 810	+ 11,48
	50	323	0,0076	25 183	28 800	+ 11,19
	54	327	0,0141	25 098	28 792	+ 11,29
	56	329	0,0208	25 000	28 788	+ 11,51
	58	331	0,0248	25 040	28 784	+ 11,31
	62	335	0,0502	24 878	28 776	+ 11,63
45	40	313	0,0107	24 166	35 374	+ 31,20
	45	318	0,0266	23 984	35 364	+ 31,18

Ceci tend à montrer que le phénomène d'activation, avec une faible variation d'entropie, modifie peu l'état d'ordre structural, mais, par contre, rend la structure moléculaire beaucoup plus fragile : la rupture de quelques liaisons supplémentaires a pour conséquence le passage à l'état dénaturé accompagné de l'effondrement complet de la structure, et d'une large variation d'entropie.

On voit sur la figure 9 que la variation d'entropie passe par une valeur minimale pour la teneur en eau de 22 p. 100 déjà signalée. Le complexe activé doit présenter un état d'organisation maximal vers 22 p. 100 de teneur en eau. Ainsi les variations de ΔS* avec la teneur en eau soulignent encore l'intervention de l'eau dans le mécanisme de la réaction.

3. *Corrélation entre les variations d'entropie et d'enthalpie.*

Nous observons sur la figure 10 une corrélation linéaire excellente ($r = 0,95$) entre les valeurs ΔS* et ΔH* ; déjà signalée par LEFFLER (1955) dans le cas de réactions en chimie organique, et par YON (1969) dans le cas de dénaturation de protéine en solution, cette relation s'observe donc également dans le cas des dénaturations en milieu solide, quelles que soient par ailleurs les conditions de la réaction.

La droite représentative a pour équation :

$$\Delta S^* = 0,0030\ \Delta H^* - 0,075$$

ΔS* étant exprimé en kcal/mole °K et ΔH* en kcal/mole.

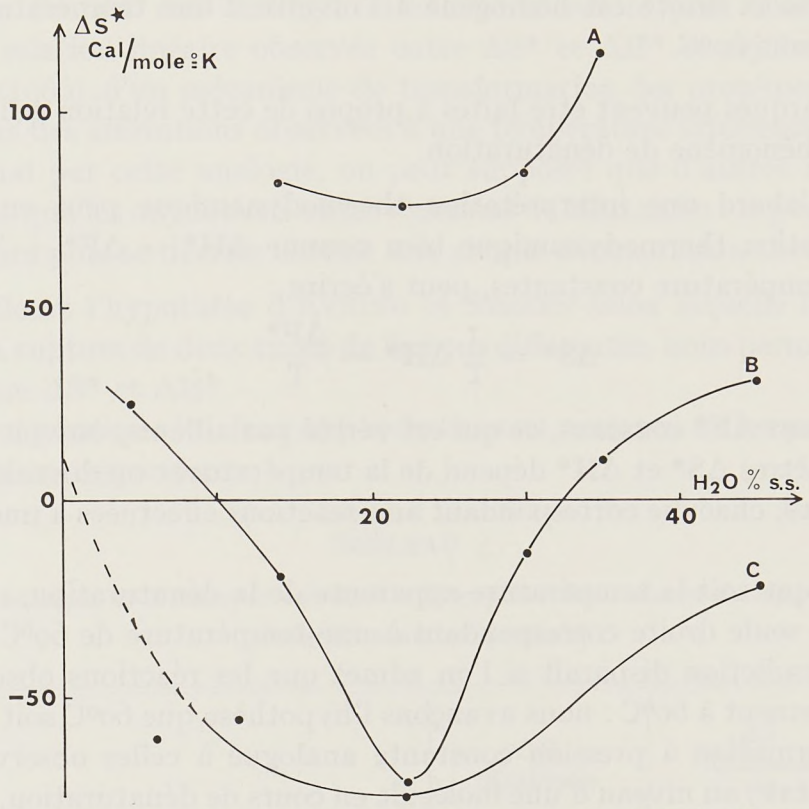


FIG. 9. — *Variation, en fonction de la teneur en eau, au cours d'un choc thermique en milieu solide, de la variation d'entropie d'activation, dans le cas du blé (temps moyen (A), RNase extractile (B)) et dans le cas de la RNase pancréatique solide (C)*

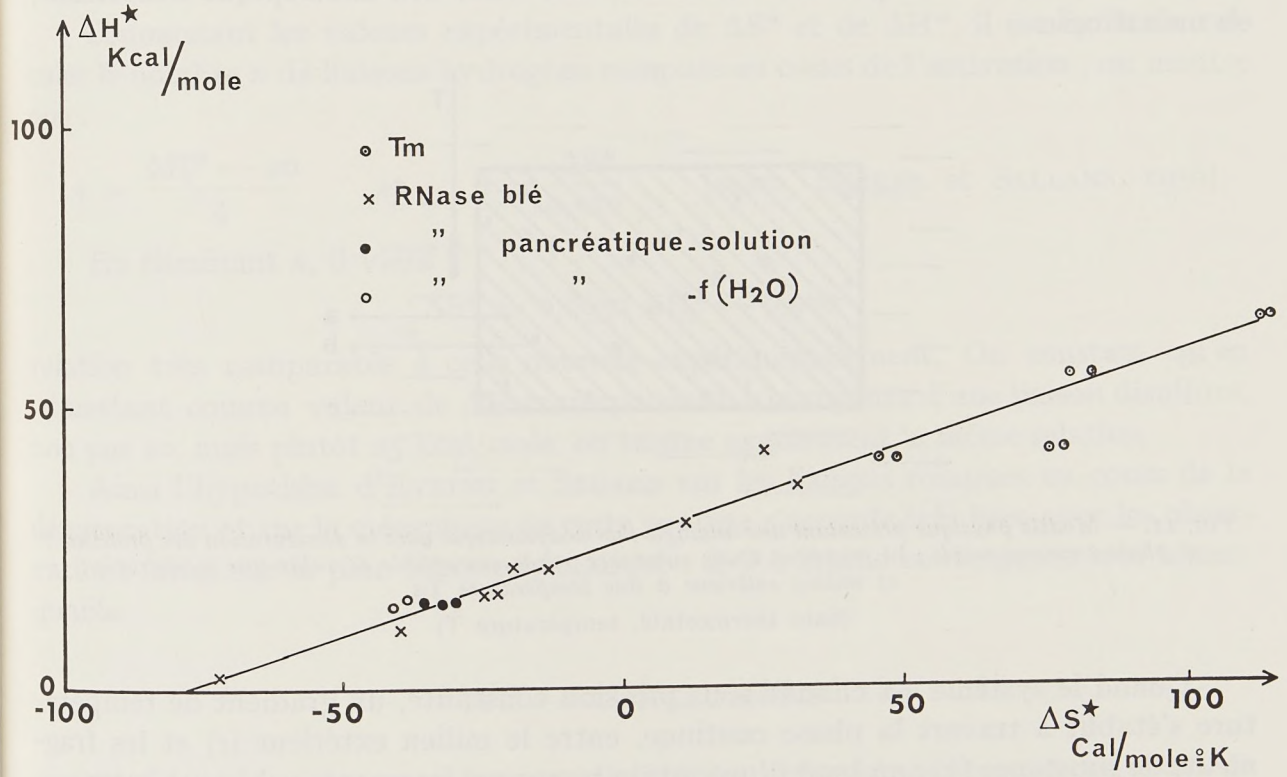


FIG. 10. — *Corrélation entre l'enthalpie et l'entropie d'activation relatives aux chocs thermiques réalisés tant sur le blé que sur la RNase pancréatique à diverses températures, teneurs en eau et durées*

Équation de la droite : $\Delta S^* = 0{,}0030\ \Delta H^* - 0{,}075$

La pente de la droite est homogène à l'inverse d'une température absolue, valeur 333°K, soit 60°C.

Deux remarques peuvent être faites à propos de cette relation qui semble caractéristique du phénomène de dénaturation.

a) Tout d'abord une interprétation thermodynamique peut en être donnée. En effet la relation thermodynamique bien connue $\Delta H^* = \Delta F^* + T\,\Delta S^*$ valable à pression et température constantes, peut s'écrire :

$$\Delta S^* = \frac{1}{T}\,\Delta H^* - \frac{\Delta F^*}{T}.$$

En supposant ΔF^* constant, ce qui est vérifié par ailleurs, on voit que la liaison entre les paramètres ΔS^* et ΔH^* dépend de la température : on devrait observer une famille de droites, chacune correspondant aux réactions effectuées à une température donnée.

Or, quelle que soit la température apparente de la dénaturation, de 40 à 220°, on observe une seule droite correspondant à une température de 60°C.

Cette contradiction disparaît si l'on admet que les réactions observées se produisent effectivement à 60°C : nous avançons l'hypothèse que 60°C soit une température de transformation à pression constante analogue à celles observées lors d'un changement d'état ; au niveau d'une molécule en cours de dénaturation, sous pression atmosphérique normale, la température serait de 60°C quelle que soit par ailleurs la valeur mesurable de la température du milieu ambiant.

Une analogie simple permet d'imager le phénomène (fig. 11). Supposons un système isolé, à une température T, d'une substance (*b*) susceptible de subir à une température T_a, et sous pression constante, une transition allotropique irréversible ou monotropie.

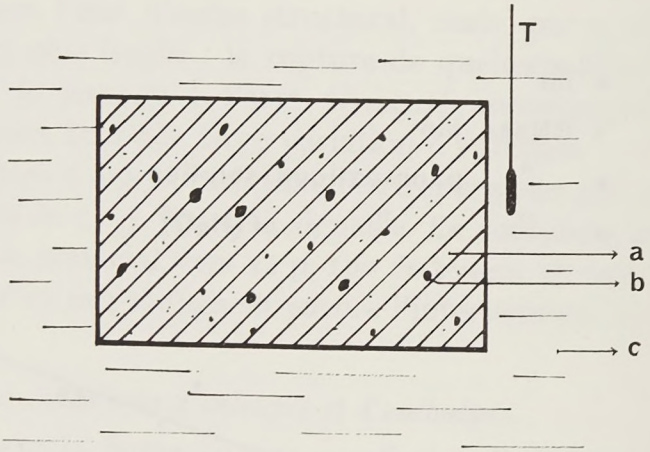


Fig. 11. — *Modèle physique présentant une analogie thermodynamique avec la dénaturation des protéines :* a) *phase continue solide ;* b) *fragment d'une substance solide susceptible de subir une monotropie ;* c) *milieu extérieur à une température Ta*
(bain thermostaté, température T)

Quand le système est chauffé sous pression constante, un gradient de température s'établit à travers la phase continue, entre le milieu extérieur (*c*) et les fragments de substance (*b*) : au bout d'un certain temps ces fragments subissent la transition monotropique en nombre d'autant plus élevé et avec une vitesse d'autant plus grande que la quantité de calories fournies est plus importante.

Ce modèle fournit une analogie satisfaisante sur le plan thermodynamique, expliquant la relation linéaire observée entre ΔS^* et ΔH^* et rejoint la théorie de LUMRY *et al.* (1966) d'un mécanisme de transformation des protéines à deux états.

Dans le cas des altérations observées à une température inférieure à 60°C, et qui s'expliquent mal par cette analogie, on peut supposer que d'autres réactions interviennent, telles que les oxydations ou les réactions de MAILLARD : le phénomène global ne pourrait alors plus se décrire comme une simple dénaturation thermique.

b) Par ailleurs l'hypothèse d'EYRING et STEARN selon laquelle la dénaturation correspond à la rupture de deux types de liaisons différentes, nous permet de retrouver la relation entre ΔS^* et ΔH^*.

Le tableau 3 indique les deux types de liaisons rompues et les paramètres thermodynamiques correspondants.

TABLEAU 3

Variations d'enthalpie et d'entropie relatives à la rupture des liaisons disulfures et hydrogène (selon EYRING et STEARN)

	ΔH Kcal/mole	ΔS Kcal/mole °K
Liaison disulfure	20	0
Liaison hydrogène	4	0,012

Connaissant les valeurs expérimentales de ΔS^* et de ΔH^*, il est facile de calculer le nombre n de liaisons hydrogène rompues au cours de l'activation ; on montre que :

$$n = \frac{\Delta H^* - 20}{4} \quad \text{et} \quad n = \frac{\Delta S^*}{0{,}012} \quad \text{(selon BECKER et SALLANS, 1956)}$$

En éliminant n, il vient :

$$\Delta S^* = 0{,}0030\ \Delta H^* - 0{,}060$$

relation très comparable à celle obtenue expérimentalement. On constate qu'en admettant comme valeur de ΔH correspondant à la rupture d'une liaison disulfure, non pas 20, mais plutôt 25 kcal/mole, on trouve exactement la même relation.

Ainsi l'hypothèse d'EYRING et STEARN sur les liaisons rompues au cours de la dénaturation et sur le mécanisme de cette rupture s'accorde très bien avec les observations faites sur le plan thermodynamique : il y a là une convergence très remarquable.

IV. — CONCLUSIONS

Cette étude montre que l'aspect général des phénomènes observés au cours de la dénaturation ne dépend ni de la méthode choisie pour apprécier la dénaturation, ni du degré de pureté de l'enzyme, ni même, semble-t-il, de l'état solide ou en solu-

tion. Par ailleurs, elle a permis de dégager un certain nombre de faits sur le rôle primordial que l'eau joue dans la dénaturation des protéines en milieu solide.

Malgré le caractère encore fragmentaire de ces observations, nous avons essayé de les réunir dans une théorie générale sur le rôle de l'eau dans les réactions de dénaturation en milieu solide.

Quand une substance solide, contenant une protéine, est chauffée à teneur en eau constante, la dénaturation irréversible peut se décrire chronologiquement de la façon suivante :

— On observe tout d'abord une courte période de latence, correspondant sans doute à une mise en équilibre thermique. La dénaturation doit commencer très lentement dès ce stade, mais ne paraît pas décelable avec les méthodes mises en œuvre.

— Ensuite, apparaît une première phase de dénaturation très rapide. Il se produit alors un remaniement profond de l'état d'équilibre énergétique des liaisons hydrogène qui provoque des variations d'H. R. E.

Elles correspondent vraisemblablement à des variations dans l'énergie de liaison de l'eau, par exemple par le passage de liaisons du type hydrogène à celles du type VAN der WAALS, sans qu'il y ait réellement rupture. Il y a augmentation de la quantité d'eau solvante, plus mobile, plus disponible et susceptible de jouer également le rôle d'agent rupteur de liaisons hydrogène.

Ces phénomènes, s'ajoutant aux perturbations résultant de l'agitation thermique, entraînent des changements très importants dans les structures de la protéine, structures dont on sait à quel point l'eau constitue un élément essentiel ; ceci a pour conséquence une dénaturation rapide. Le rôle catalytique important que joue ainsi l'eau a pour effet d'abaisser fortement l'énergie d'activation de la réaction de dénaturation.

— Cependant, au bout d'un certain temps, un nouvel état d'équilibre énergétique des liaisons de l'eau est atteint, l'H. R. E. revient à une valeur proche de celle initialement observée et la première phase prend fin.

A ce moment, une partie aliquote des molécules est dénaturée. Celles encore à l'état natif présentent des liaisons hydrogène en équilibre énergétique ; on assiste alors à une dénaturation lente, due à la seule agitation thermique, cependant catalysée par l'eau solvante apparue avec un effet maximal pour une teneur en eau de 22 p. 100.

Cette deuxième phase paraît d'ailleurs être la seule subsistant en milieu anhydre, où l'agitation thermique constitue le seul facteur dénaturant.

Par ailleurs, la relation linéaire unique entre ΔS^* et ΔH^* laisse à penser que la dénaturation procède par un mécanisme de tout ou rien, quelle que soit la phase ou la durée considérée.

En effet, au bout d'un temps donné d'action de la chaleur, un certain nombre de molécules de la protéine a subi, à la température constante de 60°C, un changement d'état brusque comparable thermodynamiquement à une transition monotropique ; il en résulte pour ces molécules la perte de leurs propriétés spécifiques.

Au bout d'un certain temps (fin de la première phase), le changement dans la vitesse du phénomène est dû à une modification du rôle de l'eau, mais ce schéma « à deux états » demeure le même.

Telle est la représentation de la dénaturation en milieu solide, et en fonction de la teneur en eau, à laquelle nous conduisent nos résultats expérimentaux.

Il est juste de souligner que certaines questions sont encore insuffisamment précisées, en particulier l'évolution du taux de dénaturation atteint au cours de la première phase en fonction de la température et le rôle des liaisons disulfures.

Ces questions peuvent faire l'objet, semble-t-il, de travaux ultérieurs susceptibles d'étayer le schéma proposé.

Indépendamment de ces aspects fondamentaux, les résultats obtenus permettent d'envisager différentes applications pratiques qui se situent sur deux plans :

— D'une part, la connaissance précise des phénomènes se produisant en milieu solide doit permettre une meilleure réalisation des opérations technologiques comportant un chauffage, telles que séchage ou cuisson par exemple. Cependant, dans le cas du séchage en particulier, les phénomènes sont plus complexes que ceux étudiés, puisqu'il y a variation simultanée de la température et de la teneur en eau.

— D'autre part, les deux critères étudiés — ribonucléase et temps moyen de germination — doivent pouvoir constituer des tests intéressants de l'état d'altération des semences, soit au cours du séchage, soit au cours de la conservation.

Malgré toutes les difficultés et les imperfections signalées, nous espérons que ces travaux pourront contribuer à définir des lois générales permettant de déterminer, à partir de quelques résultats expérimentaux, le degré de dénaturation des protéines dans les milieux complexes.

Ce sera là l'illustration de l'intérêt que présentent des travaux assez théoriques pour le progrès des industries agricoles et alimentaires.

Reçu pour publication en juillet 1970.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué grâce à la subvention de la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique (contrat 64-FR-024 du Comité Technologie agricole) à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements.

SUMMARY

STUDY IN A LESS HYDRATED MEDIUM, SUCH AS WHEAT, OF THE PART PLAYED BY WATER IN THE THERMAL DENATURATION OF CERTAIN ENZYMATIC PROTEINS

Two criterions — ribonuclease activity, and average germination period — were selected and allowed us to observe wheat proteins being denatured by thermal injuries at constant water content.

Three parameters were taken into account : temperature, water content and time, which allowed us to bring out the correlation between them.

By discussing the kinetic and the thermodynamic data, the following results were obtained:

— the denaturation reaction comprises two stages, both being first order ;

— water acts as a catalyzer, more specially during the first stage when the water bond energies are distributed again in the substance ;

— there is a linear relationship between the variations ΔS^* and ΔH^*, other things being equal ; this means denaturation can be compared to an allotropic transition.

Encompassing all these results, a general hypothesis is then formulated about the part of water in the denaturation of less hydrated proteins.

Lastly, the practical purposes of this work are discussed.

RESUMEN

ESTUDIO EN UN MEDIO POCO HIDRATATO — EL TRIGO — DEL PAPEL DEL AGUA EN EL MECANISMO DE LA DESNATURALIZACIÓN TERMICA DE CIERTAS PROTEINAS ENZIMATICAS

Dos criterios — la actividad de la ribonucleasa extraible y el tiempo de promedio de germinación — han permitido comprender la desnaturalización de las proteinas del trigo durante el transcurso de choques térmicos efectuados con un porcentaje de agua constante.

Han sido tenidos en cuenta tres parámetros dependientes — la temperatura, el porcentaje en agua y la duración — lo cual ha permitido poner de manifiesto las leyes de correlación que existen entre los mismos.

El análisis cinético y termodinámico de los resultados obtenidos ha permitido demostrar :

— que la reacción de desnaturalización consta de dos fases sucesivas del primer orden ;

— que el agua desempeña el papel de un catalizador, papel mucho más acentuado durante el transcurso de la primera fase, y que corresponde a una redistribución de las energías de enlace del agua en la substancia ;

— que existe una relación lineal única entre las variaciones ΔS^* y ΔH^*, con equivalencia condiciones, que permite asimilar la desnaturalización a una transición alotrópica.

Estos resultados han permitido formular una hipótesis general acerca del papel desempeñado por el agua en la desnaturalización en medio sólido.

Finalmente, se indican las aplicaciones que pueden efectuarse desde el punto de vista práctico.

RIASSUNTO

STUDIO IN UN MEZZO POVERO IN ACQUA, IL GRANO, DEL RUOLO DELL'ACQUA NEL PROCESSO DI DENATURAZIONE TERMICA DI ALCUNE PROTEINE ENZIMATICHE

Due osservazioni : l'attività della ribonucleosa estraibile e il tempo medio di germinazione hanno permesso di seguire la denaturazione delle proteine del grano nel corso di urti termici effettuati con un tenore in acqua costante.

Sono stati presi in considerazione tre parametri dipendenti — la temperatura, il tenore in acqua e la durata — e questo ha permesso di dedurre le leggi di correlazione che esistono tra loro.

L'analisi cinetica e termodinamica dei risultati ottenuti ha permesso di mostrare :

— che la reazione di denaturazione comporta due fasi successive del 1° ordine ;

— che l'acqua ha il ruolo di un catalizzatore, ruolo molto più accentuato durante la prima fase che corrisponde a una ridistribuzione delle energie di unioni dell'acqua nella sostanza ;

— che esiste una relazione lineare unica tra le variazioni ΔS^* e ΔH^*, tutte cose uguali per il resto che permettono di assimilare la denaturazione a una transazione allotropica.

Questi risultati hanno permesso di formulare un'ipotesi generale sul ruolo dell'acqua nella denaturazione in mezzo solido.

Si indicano infine le applicazioni che possono derivare sul piano pratico.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bachrach H. L., Breese S. S. *et al.*, 1957. Inactivation of foot and mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde (23148). *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **95**, 147-152.

Bautista G. M., Linko P., 1962. Glutamic acid decarboxylase activity as a measure of damage in artificially dried and stored corn. *Cereal Chem.*, **39**, 455-459.

Becker H. A., Sallans H. R., 1956. A study of the relation between time, temperature, moisture content and loaf volume by the bromate formula in the heat treatment of wheat and flour. *Cereal Chem.*, **33**, 254-265.

Belderock B., 1963. Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Tetrazolium-methode beider Bewaertung der Backfähigkeit von Weizen. *Getreide Mehl*, **1**, 1-5.

Bimbenet J. J., Guilbot A., 1966. Modifications biochimiques et physico-chimiques au cours du séchage. *Chim. et Industr.*, **96** (4), 1-12.

Booth R. G., 1948. Some characteristics of the nuclear enzymes of wheat. In » *Le Pain* ». Journées scientifiques du C. N. R. S., 137-142.

Cartwright T. E., Lauffer M. A., 1958. Temperature effects on *Botulinum A* toxin (24033). *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **98**, 327-330.

Eley D. D., Leslie R. B., 1964. Adsorption of water on solid proteins with special reference to haemoglobin. In : Duchesne, The structure and properties of biomolecules and biological systems. *Advances in chemical physics*, vol. **7**, Interscience Publishers.

Eyring H., 1935. The activated complex in chemical reaction. *J. Chem. Phys.*, **3**, 107-115.

Eyring H., Stearn A. E., 1939. The application of the theory of absolute reaction rates to proteins. *Chem. Rev.*, **24**, 253-270.

Guilbot A., Lindenberg A. B., 1960. Eau non solvante et eau de sorption de la cellule de levure. *Biochim. biophys. Acta.*, **39**, 389-397.

Harrison K. R., Doarks P. F., Greer E. N., 1969. Detection of heat damage in dried wheat. *Milling*, **151**, 37-38.

Hiatt C. W., 1964. Kinetics of the inactivation of viruses. *Bacteriol. Rev.*, **28** (2), 150-163.

Hutchinson J. B., 1944. The drying of wheat. Part. 3. The effect of temperature on germination capacity. *J. Soc. Chem. Industr.*, **63**, 106-107.

Hutchinson J. B., Booth R. G., 1946. Drying of wheat. Part. 4. Phosphatase activity as an index of heat damage in cereals. *J. Soc. Chem. Industr.*, **65**, 235.

Joly M., 1965. *A physico-chemical approach to the denaturation of proteins.* Academic Press, New York.

Kaplan C., 1958. The heat inactivation of Vaccinia virus. *J. gen. Microbiol.*, **18**, 58-63.

Kauzmann W., 1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1.

Klotz I. M., 1958. Protein hydratation and behavior. *Science*, **128**, 815-822.

Komemushi S., Takada N., Terui G., 1966. On the change of death rate constant of bacterial spores in the course of heat sterilisation. I. (En japonais.) *J. Ferment. Technol.*, **44** (8), 543-551.

Komemushi S., Takada N., Terui G., 1966. On the change of death rate constant of bacterial spores in the course of heat sterilisation. II. (En japonais.) *J. Ferment. Technol.*, **45** (8), 764.

Kunitz M., 1948. The kinetics and thermodynamics of reversible denaturation of crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. gen. Physiol.*, **32**, 241-263.

Leffler. J. E., 1955. The enthalpy-entropy relationship and its implications in organic chemistry. *J. org. Chem.*, **10**, 1202-1232.

Licciardello J. J., Ribich C. A. *et al.* 1967. Kinetics of the thermal inactivation of type E *Clostridium botulinum* toxin. *Appl. Microbiol.*, **15** (2), 344-349.

Lumry R., Biltonen R., Brandts J., 1966. Validity of the two state hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers*, **4** (8), 917-944.

McGuire T. A., Earle F. R., 1958. Changes in the solubility of corn protein resulting from the artificial drying of high moisture corn. *Cereal Chem.*, **35**, 179-188.

Multon J. L., Guilbot A., 1967. Méthode de détermination rapide des isothermes de sorption de vapeur d'eau. *Ann. Technol. agric.*, **16** (1), 5-25.

Multon J. L., Guilbot A., Lecourbe P., 1967. Une nouvelle méthode d'appréciation de la viabilité du blé : la mesure du temps moyen de germination. *C. R. Acad. Sci.*, **264**, 1714-1717.

Multon J. L., Lecourbe P., Guilbot A., 1968. Méthode d'appréciation de la détérioration biologique des grains par mesure du temps moyen de germination. 1st International Biodeterioration Symposium (Southampton), in : Walters A. M., Elphick J. *Biodeterioration of materials.* Elsevier. Londres.

MULTON J. L., POISSON J., GUILBOT A., 1969. Les altérations du grain de blé après la récolte. *Bull. tech. Inform.* (244), 853-870.

MULTON J. L., 1969. *Contribution à l'étude du rôle de l'eau dans les mécanismes de dénaturation thermique des protéines en milieu solide peu hydraté.* Thèse de Doctorat ès-Sciences. Faculté de Paris.

MULTON J. L., 1969. *L'activité ribonucléasique dans les céréales. Méthode de dosage.* 2e thèse Faculté de Paris.

PENCE J. W., MOHAMMAD A., MECHAM D. K., 1953. Heat denaturation of gluten. *Cereal Chem.*, **30**, 115-126.

POLLARD E. C., 1964. Thermal effects on protein, nucleic acid, and viruses, in : DUCHESNE, *The structure and properties of biomolecules and biological systems.* Intersciences Publishers, London.

PRIVALOV P. L., 1966. Manifestation of the structure of water in the thermal denaturing of macromolecules. Sostoyani Rol. Vody Biol. Ob'ektakh, Simp. Tiflis, 54-9. KAYUSHIN L. P., Izd. « Nauka » Moscow.

PRIVALOV P. L., MREVLISCHVILI G. M., 1967. Hydratation des macromolécules à l'état naturel et dénaturé. *Biofizika*, **12** (1), 22-29.

PRIVALOV P. L., 1968. Water and its role in biological systems. *Biofizika*, **13** (1), 163.

SCHERAGA H. A., 1963. Intramolecular bond in proteins. II. Non covalent bonds, in : *The proteins*, édité par NEURATH M. Vol. **1**. Academic Press, New York.

SCHERAGA H. A., 1965. The effect of solutes on the structure of water and its implications for protein structure. *Ann. New York Acad. Sci.*, **125** (2), 253-276.

SISLER E. C., JOHNSON W. H., 1965. Effect of temperature and moisture on the inactivation of o-diphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.*, **6** (4), 645-651.

STEARN A. E., 1938. The theory of absolute reaction rates applied to enzyme catalysis. *Ergebn. Enzymforsch.*, **7**, 1-27.

STEARN A. E., 1949. Kinetics of biological reactions with special reference to enzymic processes. *Adv. Enzymology*, **9** (25), 25-74.

TANFORD C., 1970. Protein denaturation. Part. C. Theorical models for the mechanisms of denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **24**, 2-246.

YON J., 1969. *Structure et dynamique conformationnelle des protéines* (Hermann, Paris).

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (3), 261-266.

NOTE

REMARQUES SUR L'INDUCTION DE MUTANTS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PAR LA NITROSOGUANIDINE

C. DIVIES et J.-N. MORFAUX
avec la collaboration technique de Ch. SCHNEIDER

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

L'induction de mutants de *S. cerevisiae* par la nitrosoguanidine a été étudiée. Le critère de mutation choisi est la résistance à la canavanine, analogue de l'arginine.

Les traitements sont effectués dans différentes conditions de temps, de dose et de pH sur des cellules en croissance exponentielle et sur des cellules non proliférantes.

Les conditions optimales de dose et de durée d'action de l'agent mutagène sont déterminées.

Il ressort de ces résultats que la proportion de mutants résistants à la canavanine est beaucoup plus élevée pour les fortes doses de NG chez les cellules en croissance que chez les cellules non proliférantes.

Quand on veut sélectionner des mutants de levures résistants à des analogues structuraux définis, on peut augmenter la fréquence d'apparition des mutants recherchés en soumettant la culture à un traitement mutagène approprié. Les propriétés mutagènes de certains composés chimiques et des radiations ionisantes sont connues, mais les modalités du traitement varient selon les produits utilisés et la nature des microorganismes.

La N – méthyl – N – nitroso – N – 'nitroguanidine (NG), dont la formule est :

$$CH_3 — N — (NO) — C (= NH) — NH — NO_2$$

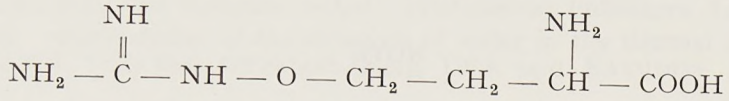
est un agent mutagène couramment utilisé en microbiologie.

Son action a été étudiée dans le cas d'*Escherichia coli* et nous ne citerons de manière extensive que : MANDELL *et al.* (1960), GREENBERG *et al.* (1961), KILGORE *et al.* (1961), ALLAN *et al.* (1966). Les conditions optimales d'emploi ont été précisées (ADELBERG *et al.*, 1965). Récemment

CERDÀ-OLMEDO et HANAWALT (1968) ont montré que la NG s'attaquait préférentiellement à l'ADN en voie de réplication.

Dans le cas des levures, des études comparables ont déjà été effectuées (SCHWAIER, 1965 ; LINGENS *et al.*, 1966 ; ZIMMERMANN *et al.*, 1967 ; NORDSTRÖM, 1967).

Dans le cadre d'un travail plus général sur l'obtention de mutants de levures riches en certains acides aminés, nous avons été amenés à sélectionner des souches résistantes à la canavanine



Pour augmenter la proportion des mutants résistants à la canavanine, nous avons utilisé la NG et recherché les conditions optimales d'emploi.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

La souche utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* 59 R haploïde, isolée à partir de la levure de boulangerie B 11 par EPHRUSSI *et al.* (1949).

Elle est cultivée sur un milieu synthétique (YCB), dont la base est constituée par le « yeast carbon base » Difco, auquel on ajoute 3 g/l de sulfate d'ammonium comme source d'azote et 4 g/l de phosphate disodique. Ce milieu est utilisé liquide ou gélosé (2 p. 100 d'agar), selon que l'on effectue une préculture ou un étalement sur boîte de Petri. La croissance des cellules, en culture agitée, a lieu à 28°C sur agitateur rotatif à plateau horizontal. Dans les fioles, telles qu'elles sont utilisées, l'oxydation mesurée par la méthode au sulfite (SCHULTZ et GADEN, 1956) est de 38 mmoles de O_2 par litre et par heure. Dans le cas d'étalement sur boîtes de Petri, l'incubation à 28°C dure 7 jours.

II. — TRAITEMENT DES CELLULES

1. *Cellules non proliférantes*

La récolte des cellules est effectuée en fin de phase exponentielle par centrifugation et lavage dans des conditions stériles. Les cellules sont ensuite reprises dans 10 ml d'eau physiologique. Les solutions de NG sont préparées dans un tampon phosphate 0,05 M et la stérilisation est réalisée par filtration sur filtre millipore HA 0,45 µ. Le traitement des cellules (concentration 10^8/ml) a lieu à la température ambiante, dans des solutions de tampon phosphate aux pH de 3,5, 4,5, 5,5, 6 et 7 et pour des doses de NG de 30, 100, 300 et 1 000 µg/ml. Les temps d'exposition sont de 10 et 25 minutes. Il convient d'ajouter, à ce temps d'exposition, 10 minutes de centrifugation à 0°C durant lesquelles les cellules sont encore en contact avec l'agent mutagène. Avant l'étalement sur boîte, les cellules sont lavées deux fois avec de l'eau physiologique, puis diluées.

2. *Cellules proliférantes*

Nous avons réalisé le traitement des cellules en croissance aux pH de 4,5 et 7. Dans ce cas le milieu de croissance des levures est plus fortement tamponné avec du tampon phosphate 0,1 M. Après 24 heures de croissance, les cellules sont directement introduites dans un nouveau milieu de même composition contenant la NG ; la stérilisation de ce milieu est effectuée par filtration comme précédemment. Après un traitement de 10 minutes à la température ambiante, les cellules sont centrifugées et lavées deux fois dans l'eau physiologique et étalées sur boîte.

3. *Dénombrement des survivants au traitement mutagène et des mutants résistants à la canavanine*

Avant chaque traitement à la NG, une partie de la suspension est réservée et constitue le lot témoin. Par étalement sur YCB gélosé contenant 30 µg/ml de canavanine, du lot témoin et des cellules traitées à la NG, on peut déterminer le nombre de mutants spontanés et induits. Le nombre de cellules vivantes avant et après le traitement est connu par numération sur YCB gélosé.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET DISCUSSION

1. *Cellules non proliférantes*

Aux différents pH de traitement des cellules non proliférantes, nous avons porté dans le tableau 1 la proportion de mutants spontanés et induits résistants à la canavanine, ainsi que le

TABLEAU I

Proportion de survivants et de mutants de S. cerevisiae 59 R *résistants à la canavanine après traitement à différentes doses de NG et à différents pH*

Les traitements de durée 10 mn ont lieu dans un tampon phosphate 0,05 M, à la température ambiante. Les résultats obtenus pour chaque pH ont été obtenus sur des lots différents. La température d'incubation des boîtes est de 28°C pendant 7 jours.

pH de traitement	Proportion de survivants et de mutants spontanés	Proportion de survivants et de mutants induits par la NG			
		30 µg/ml	100 µg/ml	300 µg/ml	1 000 µg/ml
3,5	100 $2{,}3 \cdot 10^{-5}$	63,3 $2{,}7 \cdot 10^{-3}$	33,3 $2{,}8 \cdot 10^{-3}$	2,9 $2{,}3 \cdot 10^{-4}$	0,66 10^{-3}
5	100 $6{,}1 \cdot 10^{-5}$	100 10^{-3}	20 10^{-3}	1 10^{-4}	0,24 10^{-4}
6	100 $5 \cdot 10^{-5}$	80 $0{,}86 \cdot 10^{-3}$	25 $4 \cdot 10^{-3}$	12 10^{-4}	1 —
7	100 $2 \cdot 10^{-5}$	100 $4{,}8 \cdot 10^{-3}$	6 $1{,}5 \cdot 10^{-3}$	0,5 $0{,}8 \cdot 10^{-3}$	0,07 $2{,}8 \cdot 10^{-3}$

pourcentage de cellules vivantes après le traitement. On remarquera (tabl. 2) qu'un traitement de 25 minutes, en accroissant fortement la mortalité des cellules, n'augmente pas de façon significative la proportion de mutants induits.

2. *Cellules proliférantes*

Le traitement pendant 10 minutes de *S. cerevisiae* 59 R entraîne un taux de mortalité voisin pour les doses de 30 µg/ml et 100 µg/ml, mais significativement différent pour les doses de 300 et 1 000 µg/ml. Cette fraction de la population ayant survécu à la NG est éminemment résistante à la canavanine (tabl. 3).

TABLEAU 2

Proportion de mutants spontanés et induits. Mortalité de S. cerevisiae 59 R *traité pendant 10 et 25 minutes à pH = 6. Conditions expérimentales* (v. tabl. 1)

	Dose de NG	0	30	100	300	1 000
Traitement 10 minutes	Proportions de mutants spontanés et induits	510^{-5}	$0{,}86 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	—
	p. 100 de cellules vivantes	100	80	25	12	1
Traitement 25 minutes	Proportions de mutants spontanés et induits	$7{,}7 \cdot 10^{-5}$	$1{,}84 \cdot 10^{-3}$	$2{,}62 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	—
	p. 100 de cellules vivantes	100	4,35	6,4	0,08	0,0166

TABLEAU 3

Proportion de mutants et pourcentage des cellules vivantes de S. cerevisiae 59 R *traité à différents pH dans le milieu de croissance*

Le traitement est effectué durant 10 mn à la température ambiante, les conditions expérimentales ultérieures sont les mêmes que celles signalées au tableau 1.

	Dose de NG	0	30	100	300	1 000
Traitement à pH = 4,5	Proportions de mutants spontanés et induits	$2{,}85 \cdot 10^{-5}$	$1{,}6 \cdot 10^{-4}$	$2{,}12 \cdot 10^{-3}$	$2{,}74 \cdot 10^{-3}$	0,1
	p. 100 de cellules vivantes	100	75	3,75	0,00046	0,000042
Traitement à pH = 6,5	Proportions de mutants spontanés et induits	$3{,}6 \cdot 10^{-5}$	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$	$3{,}8 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$
	p. 100 de cellules vivantes	100	40	4	0,016	0,0006

3. *Discussion*

En ce qui concerne les cellules non proliférantes et quel que soit le pH de traitement, on peut voir (tabl. 1 et 2) qu'une dose de 30 µg/ml de NG est très efficace. Dans ce cas, le traitement dure environ 20 minutes au total (10 mn d'incubation à la température ambiante + 10 mn de centrifugation à 0°C). Adelberg *et al.* (1965) avaient déjà montré, sur *E. coli*, que la NG est un agent mutagène puissant dans des conditions de survie de 50 p. 100 ; il en est de même chez la levure, puisque à pH 5, pour 100 p. 100 de survivants, on obtient une proportion de cellules mutantes de l'ordre de 10^{-3}. A partir de 10 mn de contact pour les cellules proliférantes, on n'augmente pas, de façon notable, la proportion de cellules mutantes dans la population traitée. Nous constatons (tabl. 2) qu'on augmente seulement la mortalité des cellules.

Dans les survivants il y a les mutants résistants à la canavanine et tous les autres mutants possibles, dont certains peuvent être résistants à la NG. En ce qui concerne les mutants résistants à la canavanine, nous avons vérifié qu'ils n'étaient pas en même temps résistants à la NG.

Pour les cellules en croissance, nous constatons qu'une dose de 30 µg/ml de NG n'entraîne pas de mortalité significativement différente de celle observée chez les cellules non proliférantes. Par contre, pour des doses de 100, 300 et 1 000 µg/ml, la mortalité des cellules en croissance est beaucoup plus importante. Nous observons que, pour les cellules en croissance, la population est physiologiquement hétérogène. La mortalité est beaucoup plus élevée dans le cas où les cellules peuvent se multiplier en présence de l'agent mutagène. Le pH a une grande influence sur la proportion de survivants. En effet, il y a beaucoup plus de cellules tuées à pH 4,5 qu'à pH 6,5. Notons qu'à pH 4,5, le temps de doublement de la population est d'environ 1 h 30 et qu'à pH 6, 5, il est sensiblement le double. Pour tenter d'expliquer la mortalité différente à pH 4,5 et à pH 6, 5, on peut avancer l'hypothèse suivante. On sait :

— que pour une cellule microbienne en général et pour une levure en particulier, la synthèse de l'ADN ne s'effectue pas simultanément avec celle de l'ARN et celle des protéines, mais que ces ensembles de réactions enzymatiques se suivent au cours de la vie de la cellule ;

— que l'expérimentation a été réalisée sur des cultures non synchrones.

Donc, plus le temps de doublement est court, plus une fraction importante de la population est en état de réplication de l'ADN et devient alors sensible à l'action à la fois mutagène et létale de la NG, ce qui confirme les résultats de Cerdà-Olmedo et Hanawalt.

Si nous regardons dans la population la proportion de cellules résistantes à la canavanine, ayant en même temps résisté au traitement à la NG, nous constatons pour les cellules non proliférantes que, quel que soit le pH du traitement, il existe une dose optimale d'environ 100 µg/ml de NG pour un temps de contact de 10 minutes.

En revanche, dans le cas des cellules en croissance traitées par la NG à pH 4,5 et à pH 6, 5, on observe que la proportion de mutants résistants à la canavanine est beaucoup plus élevée pour les fortes doses que dans le cas précédent.

Reçu pour publication en juin 1970.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adelberg E. A., Mandel M., Gheim Chin Chen G., 1965. Optimal conditions for mutagenis by N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K_{12}. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **18**, 788-795.

Ephrussi B., Hottinguer H., Chimenes A. M., 1949. Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation petite colonie. *Ann. Inst. Pasteur*, **76**, 351-356.

Cerdà-Olmedo E., Hanawalt P. C., 1968. The replication of the *Escherichia coli* chromosome studied by sequential nitrosoguanidine mutagenesis. *Cold. Spring. Harbor. Symp.*, **33**, 599-607.

Greenberg J., Morris J., 1961. The protection of *Escherichia coli* against inhibition by 1-meythl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. *Antibiotics and chemotherapy*, **11**, 52-57.

KILGORE W. W., GREENBERG J., 1961. Filament formation and resistance to 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine and other radiomimetic compounds in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **81**, 258-266.

LINGENS F., OLTMANUS O, 1966. Über die mutagene Wirkung von 1-nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidine (NNMG) auf *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.*, **21** *b*, 660-663.

MANDELL J. D., GREENBERG J., 1960. A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **3**, 575-577.

NORDSTRÖM K., 1967. Induction of the Petite Mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. gen. Microbiol.*, **48**, 277-281.

SCHULTZ J. S., GADEN F. L., 1956. Sulfite oxidation as a measure of aeration effectiveness. *Industr. engng. Chem.*, **48**, 2209-2216.

SCHWAIER R., 1965. Vergleichende Mutationsversuche mit sieben nitrosamiden im Rückmutationstest an Hefen. *Z. Vereibungsl.*, **97**, 55-67.

ZIMMERMANN F. K., SCHWAIER R., 1967. Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine and other alkylating agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genetics*, **100**, 63-76.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (3), 267-268.

NOTE TECHNIQUE

REMARQUES SUR UNE TECHNIQUE PERMETTANT UNE SPORULATION RAPIDE DES ZYGOTES CHEZ LA LEVURE

Françoise VEZINHET, A. ARNAUD et P. GALZY

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique,
École nationale supérieure agronomique
Centre de Recherches de Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

Cette note décrit une technique qui permet d'obtenir la sporulation des zygotes dès leur formation, avant même toute multiplication végétative.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN est hétérothallique et haplodiplobiontique. La phase haploïde est en général assez courte dans la nature. Les spores de signes opposés peuvent copuler dès l'éclatement de l'asque ou donner des lignées de cellules haploïdes qui ne tardent en général pas à copuler. En laboratoire, il est possible, grâce à la micromanipulation, d'isoler une spore et de la maintenir à l'état haploïde presque indéfiniment. A l'opposé, la technique de WINGE et LAUSTSEN (1938) permet de faire copuler immédiatement les spores après leur prélèvement au micromanipulateur. La phase diploïde est toujours plus longue. Les cellules issues d'un zygote se multiplient par bourgeonnement jusqu'à ce qu'elles rencontrent des conditions défavorables à la croissance et favorables à la sporulation.

Cette note décrira une technique qui permet d'obtenir très rapidement la sporulation directe du zygote.

I. — OBTENTION DES ZYGOTES

Les zygotes sont obtenus par la méthode de JAKOB modifiée (JAKOB, 1962 et 1965). Une préculture de chaque souche est effectuée sur milieu « yeast extract » Difco 0,5 p. 100, glucose 0,5 p. 100. Après 24 heures, les deux précultures sont diluées de manière à ce que la population soit égale à environ 10^7 cellules/ml. Un mélange est ensuite effectué : 1 ml de chacune de ces deux suspensions et 8 ml du milieu suivant : « yeast extract » 1 p. 100, peptone 1 p. 100, glucose 2 p. 100.

Après 2 heures d'agitation à 28°C, cette culture est centrifugée et laissée au repos 30 mn. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant est rejeté. Le dépôt est repris par du milieu frais. Le mélange est mis à agiter pendant 2 heures. Les copulations sont nombreuses (5 à 10 p. 100) 5 heures après le début des opérations. Les zygotes ont tous le même âge.

II. — SPORULATION DES ZYGOTES

Le milieu précédent est centrifugé ; le surnageant est jeté ; le dépôt est lavé à l'eau physiologique et centrifugé. Il est alors mis en suspension dans le milieu de sporulation de VEZINHET (1970) :

— Tampon Sörensen phosphate M/30, pH 7. Acide acétique M/5, ajusté à pH 7 à l'aide de potasse.

Ce milieu assure une bonne sporulation sans qu'aucune croissance ne se produise. Les asques sont visibles après 3 à 4 jours.

Cet ensemble de techniques permet d'obtenir la sporulation de zygotes avant qu'ils n'aient pu émettre des bourgeons. Tous les asques obtenus proviennent obligatoirement d'un zygote.

CONCLUSION

Cette méthode permet d'obtenir croisement et sporulation en 4 jours. Elle est donc beaucoup plus rapide que celle précédemment décrite (GALZY, ALBERT et PLAN, 1969). Mais le principal avantage est qu'il est possible ainsi d'obtenir la méiose dès la fusion des deux cellules parentes, ce qui peut permettre une étude des relations cytoplasme-noyau.

La levure est probablement le seul organisme où il soit actuellement possible à la fois de limiter la phase diploïde au zygote, et la phase haploïde à la spore qui a valeur de gamète.

Reçu pour publication en juin 1970

SUMMARY

REMARKS ON A TECHNIQUE ALLOWING A QUICK SPORULATION OF ZYGOTES IN YEAST

This note describes a technique to obtain zygote sporulation just after their formation without any vegetative growth.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GALZY P., ALBERT J., PLAN C., 1969. La génétique des levures. Techniques et méthodologie. *Rev. Ferment. Industr. alim.*, **24**, 161 (1re partie).

JAKOB H., 1962. Technique de synchronisation de la formation des zygotes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *C. R. Acad. Sci.*, **254**, 3909-3911.

JAKOB H., 1965. Complémentation entre mutants à déficience respiratoire de *Saccharomyces cerevisiae*. Établissement et régulation de la respiration dans les zygotes et dans leur proche descendance. *Genetics*, **52**, 75-98.

VEZINHET F., 1970. Contribution à l'étude de la sporulation chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Mycopathol. Mycol. appl.*, **40**, 15-48.

WINGE O., LAUSTSEN O., 1938. Artificial species hybridization in yeast. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **22**, 235.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *: Résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* en anglais destiné à être traduit comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12,4 photos 9 × 5,5 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Le Directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 1-1971

Dépôt légal: 1er trimestre 1971. N° d'impression: 1509.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 19 1970 NUMÉRO 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (4), 275-284.

ENTRAINEMENT PAR LES GAZ D'UN COMPOSÉ VOLATIL EN SOLUTION AQUEUSE

A. LATRASSE et A. BARRET
avec la collaboration technique de Denise Demaizières

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

L'extraction des arômes naturels en solution aqueuse par entraînement gazeux est utilisée en laboratoire pour la préparation d'échantillons destinés à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. L'aspect quantitatif de ce mode d'extraction a été étudié en réalisant un appareil expérimental et en travaillant avec une solution modèle de *n*-butanal à 0,4 p. 1 000. Une courbe expérimentale d'extraction en fonction de la température a été établie. Une légère amélioration de l'extraction est enregistrée en augmentant l'état de division du gaz vecteur (azote). Une loi expérimentale reliant le rapport de la concentration initiale à la concentration au temps t, à la masse d'azote perfusée dans l'intervalle $(o - t)$ a été établie, ainsi que l'expression d'un coefficient de partage. L'équilibre entre les phases n'a, par contre, pas pu être déterminé par l'expérience.

INTRODUCTION

La préparation pour l'analyse des échantillons de produits volatils participant aux arômes peut être réalisée suivant diverses techniques. La distillation des jus avec récupération d'une fraction de tête est la plus ancienne. L'extraction au moyen de solvants organiques volatils et peu réactifs évite les dégradations d'origine thermique. L'entraînement par les gaz méritait une étude systématique afin d'en établir les lois et d'en connaître les performances.

La perfusion d'azote à travers des jus de fruits fut expérimentée avec succès pour éliminer l'oxygène dissous (Bayes, 1950 ; Bayes, Flook et Smith, 1951 ; Eselgroth, 1951). L'entraînement des composés volatils par les gaz, tel l'anhydride carbonique, le propane, le butane, seuls ou en mélange, a été mis à profit par Drawert, Rapp et Bachmann (1962). Plus récemment, Bertrand, Boidron et Ribéreau-Gayon (1967) ont préparé par cette technique des échantillons de produits volatils émis par le vin, les jus de pomme et de raisin.

Dans l'étude systématique présentée ici, le butanal en solution aqueuse, avec une concentration initiale de 0,4 p. 1 000, constitue le composé volatil à extraire par entraînement à l'azote. Au moyen d'un appareil d'entraînement expérimental, on observe l'effet de la température sur l'extraction, puis on examine successivement les extractions isothermes en fonction de l'état de division du gaz vecteur, puis en fonction de la masse d'azote perfusée. On cherche une loi d'entraînement et l'expression mathématique du coefficient de partage avec quelques applications numériques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *L'extracteur*

L'extracteur comprend essentiellement une bouteille d'azote comprimé, une colonne en pyrex, un système de chauffage et des pièges de récupération (fig. 1).

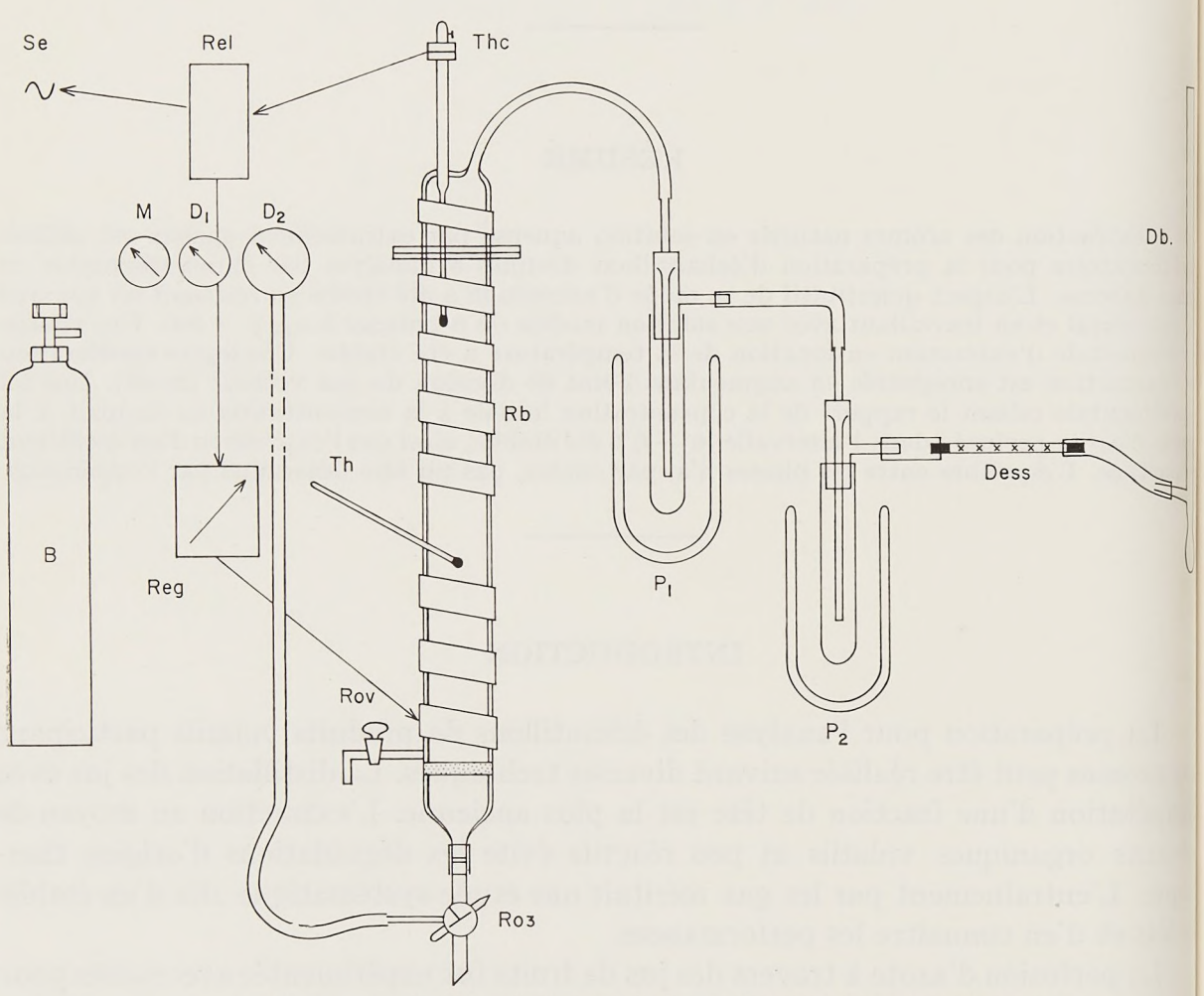


FIG. 1. — *Schéma de l'appareil à entraînement par courant gazeux*

B	Bouteille d'azote comprimé	Db	Débitmètre à bulle
M	Manomètre	Rg	Régulateur à impulsions
D_1	1re détente	Rov	Robinet de vidange
D_2	2e détente	Ro_3	Robinet à trois voies
Se	Secteur	Th	Thermomètre à mercure
Rel	Relais électronique	Thc	Thermomètre à contact
Rb	Ruban chauffant	Dess	Tube déshydratant
P_1, P_2	Pièges		

Les caractéristiques de la colonne sont les suivantes :

— capacité : 1 300 ml,
— diamètre interne : 5 cm,
— hauteur utile : 66,5 cm,
— base inférieure équipée d'un disque en verre fritté n° 3, ajusté par une tulipe rodée,
— tête de colonne avec trois sorties permettant respectivement l'introduction d'un thermomètre à contact, le remplissage de la colonne et le départ des vapeurs entraînées par le courant gazeux.

La colonne est entourée d'un ruban chauffant en élastomère. L'ensemble thermomètre à contact, relais électronique et régulateur à impulsions, permet de maintenir la colonne à la température choisie. Le gaz utilisé, l'azote, est perfusé après une double détente.

Les pièges et le tube desséchant sont utilisés pour déterminer les quantités de vapeur d'eau entraînées. Par contre, les mesures des quantités de butanal extraites sont faites par dosages spectrophotométriques sur une partie aliquote des solutions résiduelles contenues dans la colonne après extraction.

Cet extracteur est analogue à celui qui a servi à la récupération d'un concentré d'arôme de cassis (Latrasse, 1966).

B. — *Effet de primage*

La perfusion d'azote à travers la colonne liquide s'accompagne de la projection de gouttelettes qui se produisent par primage. Le débit minimum à partir duquel cet effet devient sensible a été déterminé en utilisant une solution de bichromate de potassium à 1g/l à travers laquelle l'azote est perfusé pendant 1 heure à des débits croissants. Les solutions de bichromate de potassium absorbent dans l'UV à 260 nm. Par dosage spectrophotométrique effectué sur la solution recueillie dans les pièges, on a ainsi observé l'effet de primage à partir d'une perfusion à 480 ml/mn. Cet effet minimum correspond au passage de 0,183 ml de solution sous forme de fines gouttelettes. La quantité correspondante de bichromate de potassium est de 183 µg. Comme dans la suite de cette étude nous n'avons jamais travaillé à des débits supérieurs à 400 ml/mn, l'effet de primage pourra être négligé.

C. — *Dosage des solutions résiduelles*

Nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique de Lappin et Clark (1951). Les composés carbonylés se condensent en milieu acide avec la 2-4 dinitrophénylhydrazine pour donner des 2-4 dinitrophénylhydrazones produisant une coloration rouge vineuse par addition de potasse alcoolique. Ces solutions présentent une large bande d'absorption dont le maximum est à 430 nm.

Le solvant doit être parfaitement décarbonylé. Nous avons utilisé l'éthanol. On porte au reflux pendant deux heures 500 ml d'éthanol additionné de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et de 5 g de 2-4 dinitrophénylhydrazine. L'éthanol décarbonylé est distillé deux fois avec une colonne de rectification.

Le réactif est constitué par une solution saturée de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans l'éthanol décarbonylé.

La solution de potasse alcoolique est préparée en dissolvant 10 g de potasse dans 20 ml d'eau distillée et en complétant à 100 ml avec de l'éthanol décarbonylé.

A 1 ml de solution contenant le composé carbonylé à une concentration qui ne doit pas dépasser 10^{-3} M/l on ajoute 1 ml de réactif et 1 goutte d'acide chlorhydrique concentré. On porte au bain-marie 30 mn à 50°C. La solution refroidie est additionnée de 5 ml de solution potassique. La couleur se développe très rapidement. Son intensité s'atténue après quelques heures.

RÉSULTATS

A. — *Extraction en fonction de la température*

La température agissant à la fois sur les tensions de vapeur du butanal et de l'eau, on observe que les quantités entraînées augmentent avec celle-ci. La figure 2 indique d'une part les quantités d'eau retenues dans les pièges et le tube desséchant et d'autre part les quantités de butanal extraites après des extractions effectuées

dans des conditions identiques de temps et de débit (120 mn, 100 ml/mn), mais réalisées à des températures différentes. On note les faibles quantités d'eau recueillies par rapport au volume initial mis en œuvre, ce qui permet d'admettre que l'extraction se fait à volume constant. Il faut remarquer pourtant que les quantités d'eau indiquées sur la figure 2 sont inférieures aux quantités d'eau entraînées, car on n'a pas tenu compte des condensations qui se produisent sur la tubulure de sortie de l'appareil.

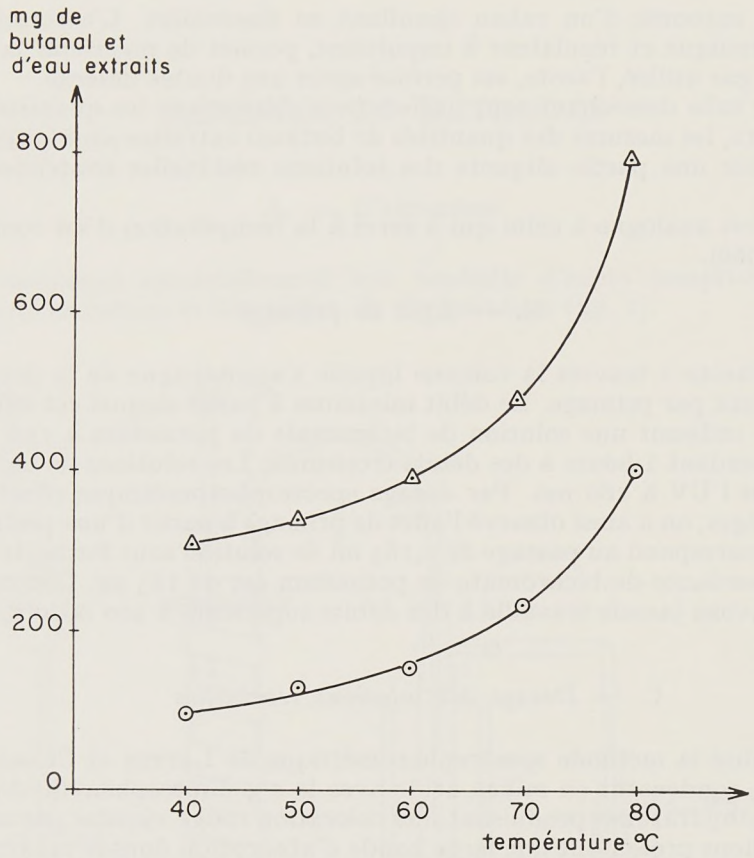


FIG. 2. — *Courbes d'extraction du butanal et de l'eau en fonction de la température*

—△—△— Quantité d'eau recueillie
—⊙—⊙— Quantité de butanal extraite
Débit d'azote : 100 ml/mn
Durée de l'extraction : 2 heures
Volume de solution traité : 1 300 ml

Pour l'étude des autres paramètres, porosité et masse de gaz, la température d'extraction est fixée à 70°C.

B. — *Étude de l'extraction en fonction de l'état de division du gaz vecteur*

On sait que pour la même masse de gaz perfusé la surface de contact entre les deux phases est d'autant plus grande que la taille des bulles est plus petite. On peut donc s'attendre à ce que l'extraction soit d'autant meilleure que la porosité des plaques employées est plus fine. En fait, l'emploi de plaques dont les porosités sont graduées de 1 à 4, ce qui correspond à une variation de diamètre moyen des pores de 120 à 15 microns, n'entraîne qu'une amélioration d'extraction à peine significative si l'on considère la reproductibilité des extractions (5 p. 100). Le tableau 1 résume les résultats obtenus. On peut donc admettre que la composition de la phase gazeuse à

l'intérieur des bulles est sensiblement la même quelle que soit la plaque utilisée, bien que les résultats expérimentaux soient légèrement en faveur des porosités les plus fines (n° 3 et 4). Dans le cas présent, les différents disques frittés utilisés donnent naissance à des bulles suffisamment petites pour que l'influence de la surface de contact ne soit pas clairement apparente dans notre expérience. Deux observations sont à mentionner. D'une part, il est visible que les bulles grossissent au cours de leur ascension dans le liquide. D'autre part, la solution traversée par le gaz prend un aspect laiteux, ce qui témoigne de l'effet tensio-actif du butanal. Il est vraisemblable, d'après nous, que cet effet tensio-actif soit le facteur limitant le plus important au transfert des molécules de la phase liquide dans la phase gazeuse. Le disque de porosité 3, perméable aux gaz, imperméable aux liquides, est utilisé pour la suite de ce travail.

TABLEAU I

Étude de l'extraction en fonction de l'état de division du gaz vecteur

Porosité n°	1	2	3	4
∅ moyen des pores en μ	120	75	30	15
p. 100 de butanal extrait	37	39	43	42

Température de la solution : 70°C.
Durée de l'extraction : 2 heures.
Débit d'azote : 100 ml/mn.
Volume de solution : 1 300 ml.

C. — *Étude de l'extraction en fonction de la masse d'azote perfusée*

Nous étudions ici les extractions isothermes du butanal en fonction de la perfusion de masses croissantes d'azote. En reprenant le raisonnement de JAULMES (1932) pour interpréter l'entraînement par la vapeur d'eau à volume constant, on pose que l'extraction de la quantité dq de butanal est proportionnelle à la quantité instantanée q présente en solution et à l'accroissement de la masse dN d'azote perfusée.

$$dq = - aq\, dN$$

Après intégration et passage aux logarithmes décimaux, on obtient :

$$\log_{10} \frac{q_0}{q} = \frac{a}{2{,}3} N$$

Nous avons vérifié que le logarithme décimal du rapport de la quantité initiale par la quantité résiduelle est une fonction linéaire de la masse d'azote perfusée (fig 3).

Les masses d'azote ont été calculées en considérant le débit, la température du gaz au niveau du débitmètre et la pression atmosphérique au moment de l'expérience.

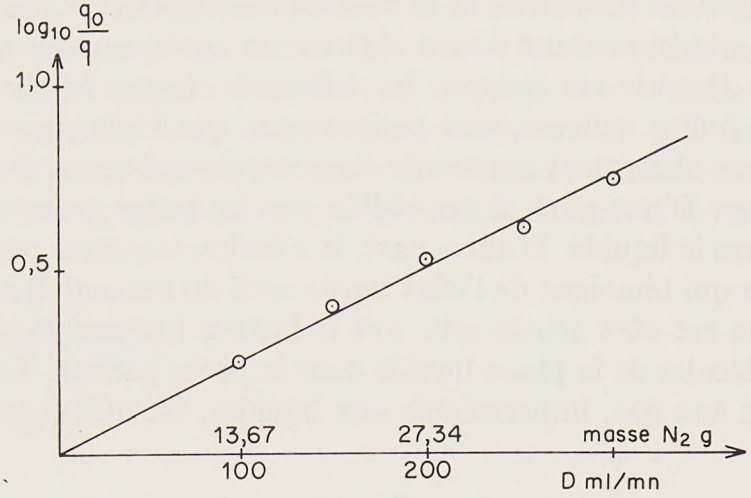


FIG. 3. — *Représentation de la loi d'entraînement*
Température d'extraction : 70°C
Durée d'extraction : 2 heures
Volume de solution traité : 1 300 ml

D. — *Expression du coefficient de partage*

Le calcul du coefficient de partage doit nous renseigner sur l'état de composition du gaz et en particulier si la saturation est atteinte, ce coefficient doit alors avoir une valeur constante. Soit C_v la concentration en butanal de la phase gazeuse émergeante et C_1 la concentration en phase liquide à l'instant t

$$K = \frac{C_v}{C_1}$$

Soit dq la quantité de butanal qui est passée avec la masse dM de vapeur d'eau dans la masse dN d'azote. En exprimant C_v comme le rapport de la masse de composé à la masse de phase gazeuse, on obtient :

$$C_v = \frac{-\,dq}{dN - dM - dq}$$

dq et dM sont des quantités qui expriment des diminutions de masse ; on les représente par des valeurs négatives.

La concentration du butanal en phase liquide s'exprime par le rapport

$$C_1 = \frac{q}{M + dM}$$

On exprime par hypothèse que le départ de vapeur d'eau satisfait à une expression différentielle semblable à celle posée pour l'entraînement du butanal

$$dM = -\,bM\,dN$$

En passant aux quantités finies, on obtient

$$\Delta M = bMN$$

Cette expression est confirmée par l'expérience. Comme la quantité d'eau entraînée au cours de l'extraction reste négligeable devant la masse initiale de solution, l'expression de la concentration en phase liquide se simplifie.

$$C_1 = \frac{q}{M + dM} \simeq \frac{q}{M}$$

Cette approximation ne se justifie naturellement que si l'extraction est limitée dans le temps. En remplaçant dq par son expression en fonction de q et de dN, il vient :

$$K = \frac{aM}{1 + bM + aq}$$

A partir de l'expression de la loi d'entraînement écrivons q en fonction de q_0 et de N :

$$q = q_0 \, e^{-aN}$$

Portons cette expression dans celle du coefficient de partage :

$$K = \frac{aM}{1 + bM + aq_0 \, e^{-aN}}$$

Nous discuterons plus loin la signification de ces différents paramètres.

Applications numériques.

La question se posait de savoir si l'augmentation de la hauteur de la colonne liquide permettait de tendre vers la saturation du gaz vecteur à la fois par la vapeur d'eau et par le butanal. L'entraînement de la vapeur d'eau a été mesuré en perfusant l'azote à travers des colonnes d'eau de hauteurs croissantes. Puis, avec les mêmes hauteurs de colonnes on a mesuré l'extraction de solutions aqueuses de butanal. Les résultats sont résumés dans le tableau 2. Les hauteurs des colonnes liquides sont proportionnelles aux masses de liquide traitées.

TABLEAU 2

Étude de l'extraction en fonction de la masse de solution traitée

Masse de solution en g.	1 300	2 400	3 660
Butanal initial q_0 en mg.	520	960	1 464
a en g^{-1}	$4{,}2 \times 10^{-2}$	$3{,}14 \times 10^{-2}$	$3{,}31 \times 10^{-2}$
b en g^{-1}	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$2{,}58 \times 10^{-5}$	$2{,}80 \times 10^{-5}$
a M	54,6	75,36	121,14
b M	$3{,}22 \times 10^{-2}$	$6{,}19 \times 10^{-2}$	$10{,}24 \times 10^{-2}$
aq_0e^{-aN}	$1{,}27 \times 10^{-2}$	$1{,}95 \times 10^{-2}$	$3{,}07 \times 10^{-2}$
Butanal extrait mg	228	336	530
K	52	70	107

Débit d'azote : 100 ml/mn.
Température d'extraction : 70°C.
Durée d'extraction : 2 heures.

Les résultats expérimentaux montrent que le gaz perfusé n'est pas saturé, donc que la hauteur de la colonne liquide est insuffisante pour atteindre cet état.

DISCUSSION

L'entraînement par les gaz satisfait à une loi semblable à celle de la distillation à volume constant (JAULMES, 1932). En effet, l'expression trouvée

$$\log_{10} \frac{q_0}{q} = \frac{a}{2{,}3} N$$

peut s'écrire :

$$\frac{q_0 - q}{q_0} = \frac{\Delta q}{q_0} = 1 - e^{-aN}$$

soit :

$$\Delta q = q_0 (1 - e^{-aN})$$

Si nous rapprochons cette dernière expression de celle de JAULMES

$$q = q_0 \left(1 - e^{\frac{-KN}{M}}\right)$$

la similitude de forme apparaît nettement. Dans ce dernier cas cependant, k représente la constante de distillation du composé qui peut être parfois assez différente de la constante de volatilité. La perfusion d'azote à travers des colonnes liquides de hauteurs croissantes ne nous a pas permis de définir un état d'équilibre entre la phase gazeuse et la phase liquide. Cet état est déterminé par un facteur de potentialité de transfert entre les deux phases. Ce facteur est représenté par la différence entre la pression limite du composé volatil présent en phase gazeuse, lorsque les deux phases sont en équilibre, et la pression partielle de ce composé, lorsque la bulle gazeuse est à un niveau donné de la colonne liquide. Les coefficients a et b sont les facteurs de potentialité respectifs pour le composé volatil et l'eau. Le coefficient a est lié à la concentration du produit volatil dans l'eau. Il est fort probable qu'il existe un gradient de concentration le long de la colonne car on ne saurait affirmer que les courants de convection soient suffisants pour créer une concentration homogène. Pratiquement le rendement de l'extraction constitue un facteur limitant à la hauteur de la colonne. La formule d'extraction permet de calculer la masse d'azote nécessaire pour épuiser la solution jusqu'à la concentration résiduelle q_i.

CONCLUSION

L'entraînement par les gaz d'un composé volatil en solution aqueuse obéit à une loi semblable à la distillation à volume constant. Cependant l'entraînement à la vapeur d'eau est représenté par une expression plus simple que l'entraînement par un gaz du fait que la phase gazeuse vectrice, dans le premier cas, est de même nature que le solvant (eau) et qu'elle est en équilibre avec la phase liquide. Dans le second cas, un état d'équilibre approché peut être déterminé par voie expérimentale.

Reçu pour publication en juillet 1970.

SUMMARY

GAS DISPLACEMENT OF A VOLATILE COMPOUND FROM AN AQUEOUS SOLUTION

In mind to fruit flavors recovery, we have studied the gas displacement of butanal from an aqueous solution, according to temperature, the porosities of sintered-glass filters used and the mass of nitrogen perfused. Gas displacement and steam distillation at constant volume obey to similar laws. The expression of a coefficient of distribution is established but the experiment has not permitted to assert vapor-liquid equilibrium.

RESUMEN

ARRASTRE POR LOS GASES DE UN COMPUESTO VOLATIL EN SOLUCION ACUOSA

La extracción de los aromas naturales en solución acuosa por arrastre gaseoso se utiliza en laboratorio para la preparación de muestra destinadas al análisis por cromatografía en fase gaseosa. El aspecto cuantitativo de este sistema de extracción ha sido estudiado por la realización de un aparato experimental y trabajando con una solución modelo de *n*-butanal a 0,4 por 1 000. Ha sido establecida una curva experimental de extracción en función de la temperatura. Una lijera mejora de la extracción se puede conseguir por aumento del estado de división del gas vector (nitrógeno). Una ley experimental, que permite obtener la correlación entre la concentración inicial y la concentración según un tiempo *t*, respecto a la masa de nitrógeno introducida por perfusión en el intervalo (o — *t*) ha sido también establecida, así como la expresión de un coeficiente de reparto. El equilibrio entre las fases no ha podido, por el contrario, ser determinado por la experiencia.

RIASSUNTO

PRODUZIONE D'UN COMPOSTO VOLATILE IN SOLUZIONE ACQUOSA MEDIANTE GAS

L'estrazione degli aromi naturali in soluzione acquosa per intervento di gas, è effettuata in laboratorio, per la preparazione di campioni destinati all'analisi per cromatografia in fase gassosa.

L'aspetto quantitativo di questo modo d'estrazione è stato studiato con l'aiuto di un apparecchio sperimentale e lavorando con una soluzione modello di *n*-butanale a 0,4 per 1 000. Si è tracciata una curva sperimentale d'estrazione in funzione della temperatura. Aumentando lo stato di divisione del gas vettore (azoto) si è avuto un leggero miglioramento dell'estrazione.

E' stata stabilita una legge sperimentale che intercorre tra il rapporto della concentrazione iniziale, la concentrazione al tempo *t* e la massa d'azoto introdotta nell'intervallo (o — *t*), come pure l'espressione d'un coefficente di divisione.

L'equilibrio tra le fasi invece non si è potuto determinare.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bayes A. L., 1950. Investigations on the use of nitrogen for the stabilization of perishable food products *Food Technol.*, **4**, 151-157.

Bayes A. L., Flook E. R., Smith P. L., 1951. Nitrogen stripping « dearerates » juices with neglible removal of volatiles. *Food process. market.*, **12** (6), 9-10.

Bertrand A., Boidron J.-N., Ribéreau-Gayon P., 1967. Méthodes d'extraction des constituants volatils des fruits et de leurs dérivés en vue d'une étude par chromatographie en phase gazeuse. *Bull. Soc. chim. Fr.*, **9**, 3149-3151.

DRAWERT P., RAPP A., BACHMANN O., 1962. Gas chromatographische Untersuchungen der Aromastoffe und Alkohole von Früchten. *Symposium Fruchtaromen*, 235-241, 1re édition, Juris Verlag, Zurich.

ESELGROTH W., 1951. Inert gas : safeguard of quality. *Food engng.*, **23** (12), 119-121.

JAULMES P., 1932. Distillation à volume constant. *J. Chim. phys.*, **29**, 403.

LAPPIN G. R., CLARK L. C., 1951. Method for trace analysis of carbonyl compounds. *Anal. Chem.* **23**, 451-452.

LATRASSE A., 1966. *Extraction des principes aromatiques du cassis. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.* Thèse, Dijon.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (4), 285-309.

CONDITIONS D'ÉLABORATION ET D'EXSORPTION DE LA THIAMINE PAR LA LEVURE

Andrée OURNAC

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

On détermine les facteurs pouvant favoriser l'élaboration et l'exsorption de la thiamine par la levure pendant et après la fermentation alcoolique.

On a étudié l'influence des facteurs suivants : race de levure, teneur en thiamine du milieu et de l'inoculum, importance de l'ensemencement, richesse en sucre du milieu, pH, sels ammoniacaux, aération, SO_2.

Les essais sont réalisés simultanément sur milieu synthétique et sur jus de raisin frais. Voici ce que l'on a constaté :

— plus l'inoculum ou le milieu fermentaire sont riches en thiamine, moins la levure en élabore et à partir de certaines doses elle en consomme ;
— plus le milieu est riche en sucre fermentescible, plus le vin est pauvre en thiamine ; au cours de son activité fermentaire la levure « use » de la thiamine ;
— le pH du jus de raisin frais serait le plus favorable à la synthèse de la thiamine par la levure, cependant un pH plus bas active la restitution ;
— l'aération, surtout en milieu synthétique privé de thiamine, provoque une forte élaboration, montrant que la levure est capable d'une synthèse totale ;
— l'exsorption, avec ou sans remise des lies en suspension, est généralement terminée au bout de 3 mois de conservation ;
— l'exsorption est d'autant plus rapide que le milieu et l'inoculum sont plus riches en thiamine.

INTRODUCTION

Ayant observé, au cours de la fermentation alcoolique du jus de raisin frais, une élaboration variable de thiamine ainsi qu'une exsorption plus ou moins rapide et plus ou moins complète dans le milieu liquide lorsque toute activité fermentaire a cessé (Ournac, 1967), nous avons entrepris une étude relative aux capacités de synthèse et de diffusion de la thiamine par la levure.

Nous avons étudié les facteurs pouvant influencer l'élaboration et la libération de la thiamine par la levure et essayé de fixer les conditions permettant à cette élaboration et à cette libération de se manifester au maximum au cours de la vinification.

La thiamine ayant un rôle biologique important, en particulier vis-à-vis de la consommation et de l'utilisation de l'alcool (mises au point de : Causeret, 1953 ; Mme Aschkenasy-Lelu, 1960 ; Trémolières, Lowy, Griffaton, 1967), il serait intéressant et surtout utile de pouvoir obtenir des vins aussi riches que possible en vitamine B_1.

D'autre part, la thiamine intervient dans l'élaboration des acides cétoniques au cours de la fermentation alcoolique, elle conduit à un abaissement du taux des acides pyruvique et α-cétoglutarique et, par suite, à une diminution du pourcentage de combinaison de l'anhydride sulfureux ajouté, d'après Lafon-Lafourcade *et al.*, 1967.

Mais l'enrichissement du vin en thiamine doit être naturel et ne provenir que de modifications légales et licites des conditions d'élaboration des vins.

Cependant, nous avons considéré certaines conditions différentes de celles autorisées pour bien saisir les actions provoquées et surtout essayer de préciser les règles qui régissent la synthèse de la vitamine B_1 par la levure.

De nombreuses études ont été réalisées sur les besoins en thiamine des différentes levures et bactéries. Une classification des levures, d'après leurs besoins en éléments du bios dont la thiamine fait partie, a même été proposée par Schultz et Atkin en 1947.

Mais beaucoup moins d'études ont été réalisées, ou surtout l'ont été de façon assez imprécise, sur les capacités et les modalités de synthèse de ce facteur de croissance par les levures.

Van Lanen et Tanner (1948) résument ainsi ce problème : les vitamines sont synthétisées, absorbées, excrétées et détruites par les microorganismes ; la vitesse et l'importance de ces activités varient avec les espèces et les conditions de culture.

Pavcek, Peterson et Elvehjem (1937, 1938) observent que les levures nécessitant la thiamine préfèrent obtenir cette vitamine par absorption à partir du milieu plutôt que par synthèse, mais qu'elles sont capables de la synthétiser jusqu'à une certaine limite dans les milieux qui en sont privés. D'après ces auteurs, la production de vitamine B_1 par la levure est augmentée par un inoculum important, une réaction acide, l'anaérobiose, une faible concentration en sucre du milieu et une température relativement basse.

Scheunert *et al.* (1939) ont montré que les levures élaborent de la thiamine à partir de milieux synthétiques simples ; Van Lanen *et al.* (1942) ont observé les mêmes résultats pour *Saccharomyces cerevisiae*.

Selon Odinsova (1941), Fink et Just (1941-1942), Lewis *et al.* (1944), des conditions d'anaérobiose sont plus favorables que des conditions d'aérobiose pour la production de vitamine B_1.

Une étude sur *Propionibacterium pentosaceum* a amené Silverman et Werkman (1939) à conclure que les bactéries qui normalement sont hétérotrophes envers la vitamine B_1 peuvent être amenées à synthétiser leurs besoins par acclimatation en l'absence de thiamine.

LEONIAN et LILLY (1943) notent un accroissement de la capacité de synthèse envers la vitamine B_1 par des cultures successives sur milieu privé de cette vitamine.

GENUNG et LEE (1944) rapportent que la thiamine présente dans le milieu influence sa production par certaines souches d'*Escherichia coli*. D'autre part, VAN LANEN et TANNER (1948) estiment que la présence d'une vitamine dans le milieu n'affecte pas sa synthèse ; certaines bactéries retiennent la thiamine synthétisée et absorbent celle ajoutée au milieu.

Les auteurs russes PARKHOMENKO et CHAGOVETS (1967) montrent que la présence de thiamine dans le milieu inhibe sa biosynthèse par *Saccharomyces cerevisiae*.

FINK et JUST (1941-1942) obtiennent des *Torula*, des levures de boulangerie et de brasserie qui, après avoir été cultivées dans les mêmes conditions, renferment des quantités de thiamine identiques, ce qui indique que l'espèce de levure n'est pas un facteur essentiel de la teneur en thiamine de la levure.

Toujours d'après les mêmes auteurs, la prolifération en aérobiose, comme c'est le cas pour *Torula* et les levures de boulangerie, provoque des pertes sensibles de la thiamine du milieu et de faibles concentrations dans la levure. Au contraire, un métabolisme fermentatif, comme c'est le cas pour les levures de brasserie, favorise l'absorption de la thiamine du milieu sans perte et sa synthèse par *Torula*.

Nous allons essayer de déterminer l'influence sur la synthèse de la thiamine et sur son rejet dans le milieu par la levure des facteurs suivants : l'espèce de levure, la teneur en thiamine du milieu et de l'inoculum, l'importance de l'ensemencement, la richesse en sucre du milieu, le pH, les sels ammoniacaux, l'aération, le SO_2.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les essais sont réalisés simultanément sur milieu synthétique et sur jus de raisins frais. Sauf indication, le milieu synthétique est ensemencé à raison de $2 \cdot 10^6$ germes par ml et les jus frais à raison de $10 \cdot 10^6$. Les milieux synthétiques sont faiblement ensemencés pour éviter un trop grand apport de thiamine par l'inoculum, les jus frais sont ensemencés à des doses beaucoup plus fortes pour supprimer l'influence des levures indigènes. Les modalités d'élaboration du milieu synthétique, du levain, ainsi que de l'ensemencement sont identiques à celles utilisées précédemment (OURNAC, 1969).

Étant donné que les levures (OURNAC, 1969) sont capables de faire fermenter complètement un milieu synthétique privé de thiamine, avec cependant une vitesse inférieure à celle déployée en sa présence, on a effectué chaque essai synthétique en deux exemplaires, l'un en présence de thiamine, l'autre en son absence.

En dehors des levures à teneurs variables en thiamine, toutes les levures utilisées ont une teneur les rendant sensibles, vis-à-vis de la vitesse de fermentation, à la présence de ce corps dans le milieu fermentaire, c'est-à-dire entre 6 et 10 mg par 100 g de poids sec.

Plusieurs souches de levures d'origine différente, du genre *Saccharomyces cerevisiae*, variété *ellipsoideus* et *S. oviformis*, ainsi que du genre *Rhodotorula* ont été utilisées. Les *S. ellipsoideus* ont été isolées soit dans des moûts en fermentation : levure n° 10, soit sur la surface de raisins mûrs : levure n° 11, dont les cellules sont de petite taille et levure n° 8. En particulier, le laboratoire de la Chaire de Génétique de Montpellier nous a donné des souches de *Saccharomyces cerevisiae* accompagnées de leur mutant à déficience respiratoire ; leurs dénominations sont les suivantes : 183 et 4 pour les souches mères, 183 P_c et 4 P_c pour les souches de mutants correspondants.

Dès la fermentation terminée, ce que l'on constate par l'arrêt de la perte de poids, on prélève un échantillon de vin clair, soit V_c, puis on homogénéise l'essai et on sépare par centrifugation les lies du vin d'une partie aliquote. La vitamine B_1 est évaluée séparément sur la partie liquide V_t et sur les lies, ce qui donne la teneur totale du milieu exprimée en $\mu g/l$. Le vin est ensuite conservé au contact des lies avec plusieurs remises en suspension, suivies de repos. La thiamine apportée par le levain est évaluée séparément et retranchée de chaque essai.

Le dosage de la thiamine est réalisé selon OURNAC et FLANZY (1957). Dans les jus de raisins frais et les vins correspondants, la vitamine B_1 se trouve sous forme libre, non estérifiée et les dosages sont effectués sans hydrolyse enzymatique. Dans un seul cas, vins provenant de jus portés à pH 2, la thiamine se trouve en partie sous forme d'ester phosphorique ; l'hydrolyse enzymatique a été ici pratiquée. Les milieux synthétiques ont tous nécessité l'hydrolyse enzymatique. Dans les levures le dosage comporte toujours une double hydrolyse : acide et enzymatique.

L'aération est réalisée par l'agitation continuelle d'un faible volume de jus, 500 ml, dans un erlenmeyer à large ouverture de 2 litres de capacité.

RÉSULTATS

1. — *Absorption de la thiamine présente dans le milieu fermentaire*

Toutes les levures considérées manifestent une grande rapidité et une grande capacité d'absorption de la thiamine qui leur est offerte, autant dans les milieux synthétiques que dans les jus de raisins frais. Pour des milieux synthétiques ou naturels renfermant jusqu'à 1 000 µg de thiamine par litre, l'absorption est totale au plus tard le 2e jour de la fermentation ; dans certains cas, elle est terminée avant même que la fermentation soit décelable par une perte de poids. L'avidité avec laquelle les levures absorbent la vitamine B_1 du milieu montre qu'elle doit jouer un rôle important dans le métabolisme de la cellule (PAVCEK, PETERSON et ELVEHJEM, 1947).

2. — *Élaboration de thiamine*

Nous allons considérer uniquement la teneur totale en thiamine à la fin de la fermentation, c'est-à-dire vin t + lies, exprimée par litre et diminuée de l'ensemencement. Cette valeur comparée à la teneur du jus initial nous renseignera sur la conservation, la destruction et l'élaboration de thiamine dans les différentes conditions réalisées.

1° *Influence de la levure* (tabl. 1 et 2).

— En milieu synthétique sans thiamine, chaque levure synthétise des quantités particulières s'échelonnant entre 12 et 40 µg/l ; les différences ne sont pas très importantes, mais permettent tout de même une certaine classification des levures d'après leur pouvoir de synthèse ; la levure 10 est une bonne productrice de thiamine, tandis que la levure 4 en produit très peu.

— En milieu synthétique renfermant de la thiamine à raison de 300 µg/l, c'est-à-dire la quantité moyenne qui se trouve dans les jus de raisins frais, les levures n'en synthétisent plus, mais, au contraire, en consomment, cette consommation variant selon la souche de levure utilisée. Ces résultats ainsi que les précédents ne sont peut être qu'apparents. Étant donné que la thiamine présente dans le milieu fermenté résulte de la différence entre la thiamine élaborée et la thiamine consommée, il se peut que la synthèse soit ici masquée par la consommation.

Les deux phénomènes, élaboration et destruction, doivent se produire simultanément mais avec des amplitudes différentes selon la quantité de thiamine présente et selon la levure. De toute façon, en milieu synthétique, c'est-à-dire renfermant juste les éléments nécessaires à leur activité fermentaire, les levures ont besoin d'une certaine quantité de thiamine qu'elles détruisent.

— En milieu naturel : d'une façon générale, pendant la fermentation du jus de raisin frais, les levures synthétisent de la thiamine. Dans nos essais, la quantité maximum élaborée a atteint 110 µg/l pour un moût renfermant à l'origine 166 µg/l, soit 65 p. 100 d'augmentation.

TABLEAU I

Influence de la levure sur l'élaboration et l'exsorption de la thiamine
Milieu synthétique avec et sans thiamine. Ensemencement $2 \cdot 10^6$

Thiamine µg/l

Levures	Élaboration					Exsorption		
	Lies des vins	Vin t	Total V_t + lies	Total sans ensemencement	Thiamine élaborée ou consommée	Vins sur lies		
						15 jours	1 mois	2 mois
	Milieu sans thiamine							
1 — n° 10	38	10	48	42	+ 42	32		
2 — n° 4	19	0	19	14	+ 14	11		
3 — n° 183	38	0	38	33	+ 33	10		
4 — n° 183 P_c	29	0	29	23	+ 23	18		
5 — n° 8	10	10	20	16	+ 16	18		
6 — n° 11	19	0	19	14	+ 14	9		
7 — *S. oviformis*	29	10	39	34	+ 34	18		
8 — *Rhodotorula*	28	10	38	34	+ 34	18		
	Milieu avec thiamine — 384 µg/l							
1 — n° 10	42	267	309	307	— 77	268	286	290
2 — n° 4	270	34	334	325	— 59	78	74	105
3 — n° 183	359	25	384	380	— 4	98	74	76
4 — n° 183 P_c	309	59	368	363	— 21	106	157	191
5 — n° 8	242	117	359	355	— 29	163	148	229
6 — n° 11	309	34	343	339	— 45	69	65	95
7 — *S. oviformis*	184	142	326	322	— 62	244	277	276
8 — *Rhodotorula*	0	250	250	246	— 138	260	250	257

On assisterait ici à une synthèse supérieure à la consommation, contrairement à ce qui se produit en milieu synthétique vitaminé. On peut avoir recours à deux hypothèses pour expliquer cette différence de comportement de la levure dans les milieux naturels et synthétiques renfermant de la thiamine :

1. le milieu naturel renferme certains éléments permettant une synthèse importante ;

2. les levures évoluant dans le milieu synthétique ont des besoins en thiamine supérieurs à celles évoluant dans le milieu naturel.

Ceci montre que la composition d'un milieu fermentaire, et en particulier sa richesse en vitamine B_1, influe sur le comportement des levures envers cette vitamine.

TABLEAU 2

Influence de la levure sur l'élaboration et l'exsorption de la thiamine. Jus de raisin frais. Ensemencement à 10 · 10⁶ germes/ml

	Thiamine µg/l											
	Fermentation	Élaboration						Exsorption				
								Vins sur lies Vitamine B_1			Pourcentage de restitution	
	1er jour de fermentation	Lies des vins	V_c	V_t	Total	Total sans ensemencement	Vit. B_1 élaborée ou consommée	3 mois	6 mois	8 mois	3 mois	6 mois
1 — Jus naturel	0	249	0	0	249	—	+ 83	200	213	208	80	86
2 + Levure nº 10	0	110	20	186	296	275	+ 110	222	247	241	75	84
3 + Levure nº 4	46	234	0	0	234	213	+ 53	148	172	160	63	74
4 + Levure nº 4 P_c	46	245	0	0	245	213	+ 53	131	184	171	53	75
5 + Levure nº 183	0	277	0	0	277	235	+ 69	210	264	263	76	95
6 + Levure nº 183 P_c	5	305	0	0	305	262	+ 96	231	259	246	76	85
7 + Levure nº 11	15	289	0	0	289	251	+ 85	222	253	250	77	88
8 + *S. oviformis*	0	189	0	0	189	169	+ 3	173	190	180	91	100
9 + *Rhodotorula*	5	207	0	0	207	160	— 6	156	160	150	75	77

Teneur en thiamine du jus frais : 166 µg/l.

2° *Influence de la teneur en thiamine du milieu fermentaire* (tabl. 3 et 4).

— Milieu synthétique renfermant de 0 à 600 µg de thiamine/l.

Comme nous venons de le voir, dans un milieu synthétique sans thiamine, les levures en synthétisent, et dès que la thiamine est présente, même à faible dose (50 µg/l), elles en consomment.

TABLEAU 3

Influence de la teneur en thiamine du milieu sur l'élaboration de la thiamine
Milieu synthétique. Ensemencement à 2 · 10⁶ germes/ml

Thiamine µg/l	Levure 10			Levure 183			Levure 183 P_c		
	Vit. B_1 totale Vin t + lies µg/l	Vit. B_1 élaboré ou consommée		Vit. B_1 totale Vin t + lies µg/l	Vit. B_1 élaborée ou consommée		Vit. B_1 totale Vin t + lies µg/l	Vit. B_1 élaborée ou consommée	
		µg/l	p. 100		µg/l	p. 100		µg/l	p. 100
0	46	+ 46		20	+ 20		43	+ 43	
50	48	— 2	— 4	46	— 4	— 8	48	— 2	— 4
100	85	— 15	— 15	80	— 20	— 20	69	— 31	— 31
200	167	— 33	— 16	164	— 36	— 18	141	— 59	— 30
600	474	— 126	— 21	440	— 160	— 26	392	— 208	— 35

Cette consommation est d'autant plus importante que la quantité de thiamine au départ est plus élevée et varie avec la nature de la levure. Les pertes de thiamine à la fin de la fermentation s'échelonnent entre 4 et 35 p. 100 pour des concentrations au départ allant de 50 à 600 µg/l.

— Milieu naturel. Si on considère la fermentation de jus de raisins dans lesquels on a pratiqué des additions croissantes de thiamine, de 50 à 800 µg/l, ce qui porte la teneur du moût de 200 à 1 000 µg/l et plus, on constate que les levures élaborent de la thiamine dans les milieux de plus faibles concentrations, puis dans les milieux de concentrations plus élevées en consomment une partie.

La concentration en vitamine B_1 à partir de laquelle la synthèse fait place à la consommation varie avec la souche de levure considérée et permet de différencier les levures selon leur capacité de synthèse. La levure 10 qui manifeste par ailleurs un fort pouvoir de synthèse ne commence à consommer la thiamine qu'à partir de 800 µg/l, alors que les autres levures commencent déjà aux environs de 300 µg/l. L'élaboration de la thiamine par la levure est d'autant plus faible et la consommation est d'autant plus importante que le milieu au départ est plus riche en ce corps, ceci à l'intérieur des limites de manifestation de chaque phénomène. On peut conclure que plus un milieu fermentaire est riche en thiamine, plus les levures ont tendance à la consommer.

3° *Influence de la teneur en thiamine de l'inoculum* (tabl. 5).

En utilisant des milieux de culture additionnés de 0, 100, 500, 1 000, 2 000, 3 000, 4 000, et 5 000 µg de thiamine par litre, on a obtenu des levures en pleine activité renfermant respectivement : 3 à 5, 9, 20, 26, 48, 90, 115 et 155 mg de thiamine

TABLEAU 4

Influence de la teneur en thiamine du milieu sur l'élaboration et la restitution de la thiamine
Jus de raisin frais naturel et ensemencé à raison de $10 \cdot 10^6$ germes/ml

Thiamine ajoutée en µg/l	Thiamine µg/l												
	Fermentation			Élaboration							Exsorption		
	Jus départ	1er jour de fermentation	2e jour de fermentation	Lies des vins	Vin *c*	Vin *t*	Total V_t + lies	Total sans Vit. B_1 de l'ensemencement	Vit. B_1 élaborée ou consommée	p. 100 élaboration ou consommation	Vit. B_1 des vins 3 mois sur lies	p. 100 restitution après 3 mois sur lies	p. 100 restitution dans V_t
1 — Jus frais ..	179	0	0	189	—	13	202	—	+ 23	+ 13	196	97	6
2 + 100	263	0	0	228	—	25	253	—	— 10	— 3,5	250	100	9
3 + 600	734	267	7	360	278	350	710	—	— 31	— 4,5	703	99	49
4 + 800	980	476	26	473	357	437	910	—	— 80	— 8	900	99	48
Levure 183													
1 — Jus	179	0	0	124	51	96	220	197	+ 18	+ 10	220	100	43
2 + 100	263	9	0	140	51	133	273	250	— 13	— 5	263	96	49
3 + 600	734	13	0	419	280	281	700	677	— 57	— 8	690	98,5	40
4 + 800	980	13	0	435	270	475	910	887	— 93	— 9,5	907	99,5	52
Levure 183 P_c													
1 — Jus	179	53	0	200	—	17	217	204	+ 31	+ 17	210	97	8
2 + 100	263	26	0	234	—	29	263	250	— 13	— 5	240	91	11
3 + 600	734	200	7	580	90	92	680	660	— 74	— 10	667	98	15
4 + 800	980	125	0	704	155	146	864	837	— 143	— 15	854	99	19

TABLEAU 5

Influence de la teneur en thiamine de l'inoculum sur l'élaboration de la thiamine
Milieu synthétique. Ensemencement à raison de $2 \cdot 10^6$ germes/ml. Levure n° 10

1er essai

	Vit. B_1 de l'inoculum (mg/100 g de sec)	Vit. B_1 du milieu (μg/l)	Vit. B_1 de l'ensemencement (μg/l)	Lies des vins Vit. B_1 (μg/l)	Vin *t* Vit. B_1 (μg/l)	Total V_t + lies (μg/l)	Total sans vit. B_1 de l'ensemencement (μg/l)	Vit. B_1 élaborée ou consommée (μg/l)	p. 100 de vit. B_1 consommée
N° 1	3	0	2	120	18	138	136	+ 136	
N° 2	—	100	—	28	55	83	81	— 19	19
N° 3	26	0	14	18,5	9	28	14	+ 14	
N° 4	—	100	—	37	47	84	70	— 30	30
N° 5	48	0	26	18,5	18,5	37	11	+ 11	
N° 6	—	100	—	18,5	55,5	74	48	— 52	52
N° 7	115	0	69	32	11	43	0	0	
N° 8	—	100	—	75	43	118	49	— 51	51

2e essai

N° 1	5	0	1,5	14	27	41	39,5	+ 39,5	
N° 2	—	100	—	20	67	87	85,5	— 14,5	14,5
N° 3	—	800	—	47	600	647	645,5	— 154,5	19
N° 4	155	0	86	14	67	81	0	0	
N° 5	—	100	—	20	130	150	64	— 36	36
N° 6	—	800	—	67	620	687	601	— 200	25

dans 100 g de poids sec et qui apportent pour un ensemencement à $2 \cdot 10^6$ germes par ml : 1, 5, 8, 14, 26, 43, 69 et 86 μg de thiamine par litre. Ces levures ont servi à ensemencer des milieux synthétiques renfermant différentes quantités de thiamine.

Il faut distinguer deux cas : milieu sans et avec thiamine.

— Milieu sans thiamine : plus les levures sont riches en thiamine, moins elles en synthétisent et à partir d'une certaine teneur, elles n'en synthétisent plus du tout. Cette teneur correspond à un apport de thiamine voisin de 60 $\mu g/l$, c'est-à-dire la teneur minimum qui permet à la fermentation alcoolique de se poursuivre avec une vitesse maximum (OURNAC, 1969).

— Milieu avec thiamine : on observe une consommation générale de thiamine qui s'accentue au fur et à mesure que la teneur de l'inoculum en ce corps augmente. C'est-à-dire que plus les levures sont riches en thiamine, moins elles en élaborent et plus elles en consomment.

4° *Influence de l'importance de l'inoculum* (tabl. 6).

L'ensemencement était réalisé comparativement à raison de $20 \cdot 10^6$ et $50 \cdot 10^6$ germes par ml avec différentes levures.

— Milieu synthétique dépourvu de vitamine B_1 : l'élaboration de thiamine est d'autant plus faible que l'inoculum est plus important. Dans notre cas, un ensemencement à raison de $50 \cdot 10^6$ germes par ml apporte toujours plus de thiamine qu'il ne faut pour qu'une synthèse ultérieure ne soit pas nécessaire ; nous retrouvons la conclusion du paragraphe précédent : plus l'inoculum est riche en thiamine, et plus il est important plus il est riche, moins les levures qui le composent en élaborent.

— Jus de raisins frais. De tels ensemencements provoquent toujours dans le jus de raisin une augmentation de la synthèse thiaminique. Mais cette augmentation n'est pas très importante : elle varie de 40 à 100 μg par litre. De plus, il n'y a pas proportionnalité entre le nombre de levures au départ et la quantité de vitamine élaborée. Cette augmentation de synthèse consécutive à celle de l'ensemencement est plus importante pour les levures bonnes productrices de thiamine, telle la levure n° 10.

5° *Influence de la richesse en sucre fermentescible du milieu* (tabl. 7 et 8).

Les jus naturels sont enrichis au moyen de saccharose. Dans les milieux synthétiques à 5° d'alcool en puissance, un enrichissement du même ordre est à nouveau pratiqué dès la fin de la fermentation.

— Dans les milieux synthétiques privés de thiamine, plus la teneur en sucre est élevée et plus l'élaboration de thiamine est faible.

— Dans les milieux synthétiques renfermant de la thiamine, on assiste à une consommation qui s'accentue avec la richesse en sucre et en thiamine du milieu.

— Dans les milieux synthétiques ayant subi une deuxième addition de sucre, la deuxième fermentation provoque toujours une diminution de thiamine ; cette diminution est d'autant plus faible que la teneur en thiamine présente dans le milieu est élevée.

— Ces résultats se retrouvent pour les jus frais fermentant avec leur flore naturelle : plus le jus est enrichi en sucre, plus le vin est pauvre en thiamine.

On peut déduire de ces observations que, au cours de son activité fermentaire, la levure use de la thiamine.

TABLEAU 6

Influence de l'importance de l'inoculum sur l'élaboration et l'exsorption de la thiamine
Jus de raisin frais. Ensemencement à 20 · 10^6 et 50 · 10^6 germes/ml

Ensemencement en 10^6/ml	Fermentation	Élaboration							Exsorption						
		Vitamine B_1 µg/l							Vins sur lies Vit. B_1 µg/l						
	Vit. B_1 — 1er jour	Lies des vins	Vin avant la fin de la fermentation	V_c	V_t	Total V_t + lies	Total sans ensemencement	Thiamine élaborée ou consommée	8 jours	15 jours	21 jours	1 mois	3 mois	6 mois	p. 100 de restitution à 3 mois
1 — Jus naturel	9	154	20	77	86	240	—	— 30	150	167	200	207	241	230	100
2 — Levure 10 — 20	9	226	0	140	154	380	323	+ 53	150	305	350	350	380	360	100
3 — Levure 10 — 50	0	197	0	257	282	479	337	+ 67	290	400	434	440	464	450	97
4 — Levure 4 — 20	9	305	0	—	35	340	315	+ 45	40	140	159	220	334	320	98
5 — Levure 4 — 50	9	345	0	—	35	380	317	+ 47	40	157	192	227	360	350	95
6 — *Rhodotorula* 20.....	35	236	0	129	129	365	321	+ 51	130	278	342	342	340	320	93
7 — *Rhodotorula* 50.....	43	43	0	350	350	390	278	+ 8	350	360	367	374	380	370	97

Teneur en thiamine du jus frais : 270 µg/l.

TABLEAU 7. — *Influence de la richesse en sucre du milieu sur l'élaboration de la thiamine*
Milieu synthétique. Ensemencement levure 10 à 2 · 10⁶ germes/ml. Vitamine B_1 en µg/litre

Teneur en sucre exprimée en degré alcoolique en puissance	Vit. B_1 Vin t	Vit. B_1 Lies des vins	Vit. B_1 Totale V_t + lies	Vit. B_1 Totale sans ensemencement	Vit. B_1 élaborée ou consommée	Perte p. 100 de vit. B_1
Milieu sans vit. B_1						
1 — 5°	13	37	50	47	+ 47	
2 — 8°	17	20	37	34	+ 34	
3 — 12°	14	8	22	19	+ 19	
Milieu à 100 µg/l vit. B_1						
4 — 5°	9	84	93	90	— 10	10
5 — 8°	17	71	88	85	— 15	15
6 — 12°	50	29	79	76	— 24	24
Milieu à 400 µg/l vit. B_1						
7 — 5°	42	253	295	292	— 108	27
8 — 8°	96	208	304	301	— 99	25
9 — 12°	258	21	279	276	— 124	31
Enrichissement en sucre des vins finis n° 1 — 4 et 7						
Milieu sans vit. B_1 N° 1 + 5°	14	14	28	25	— 22	47
Milieu à 100 µg/l vit. B_1 N° 4 + 5°	8	62	70	67	— 23	25,5
Milieu à 400 µg/l vit. B_1 N° 7 + 5°	90	143	233	230	— 62	21

TABLEAU 8. — *Influence de la richesse en sucre du milieu sur l'élaboration de la thiamine*
Jus de raisin frais naturel, enrichi en sucre, ensemencé à 10 · 10⁶ germes/ml

	Vitamine B_1 µg/l					
	Jus départ	Lies des vins	Vin$_t$	Total V_t + lies	Total vit. B_1 sans ensemencement	Élaborée ou consommée
Jus non levuré						
1 — 8°8	247	305	63	368	—	+ 121
2 — 11°7	235	309	22	331	—	+ 96
3 — 14°7	225	305	13	318	—	+ 93
Jus + Levure 10						
1 — 8°8	247	60	250	310	280	+ 33
2 — 11°7	235	50	275	325	295	+ 60
3 — 14°7	225	71	233	304	274	+ 39
Jus + Levure 183 Pc						
1 — 8°8	247	258	36	294	255	+ 8
2 — 11°7	235	217	85	302	263	+ 28
3 — 14°7	225	158	167	325	286	+ 61

Jus n° 1 : Jus frais naturel — Sucre : 150 g/l — Degré alcoolique en puissance : 8°8 ;
Jus n° 2 : Jus frais + 50 g/l de sucre — Degré alcoolique en puissance : 11°7 ;
Jus n° 3 : Jus frais + 100 g/l de sucre — Degré alcoolique en puissance : 14°7 ;

— Mais, lorsque le jus de raisin frais est préalablement ensemencé à raison de $10 \cdot 10^6$ germes par ml, l'enrichissement en sucre provoque généralement une augmentation de la teneur du vin en thiamine. Ici la consommation de thiamine serait masquée par une élaboration accrue résultant du nombre élevé de levures.

6° *Influence du pH du milieu* (tabl. 9).

Des jus frais, levurés et non levurés, ont été amenés à pH 2 et 4 par additions respectives de solutions d'acide sulfurique et de potasse avant le début de la fermentation. Il faut noter tout d'abord que les jus frais à pH 4 ont fermenté très rapidement alors que ceux à pH 2 ont fermenté très lentement et que les milieux synthétiques à pH 2 ne sont jamais entrés en fermentation.

A pH 4, dans tous les cas considérés de jus frais de pH 4 levurés ou non, les vins finis ont des teneurs en vitamine B_1 bien inférieures, de 5 à 34 p. 100, à celles des vins provenant de jus dont le pH est resté normal, c'est-à-dire voisin de 3, et généralement inférieures à celles des jus d'origine. Pour le seul jus synthétique expérimenté les résultats sont identiques aux précédents.

A pH 2, des pertes considérables de thiamine sont constatées au cours de la fermentation de jus de raisins frais ; elles sont à peu près du même ordre que celles observées à pH 4 ; elles s'échelonnent entre 7 et 37 p. 100.

On peut dire que les pH 4 et 2 favorisent la consommation de la thiamine pendant la fermentation. Il semble que ce soit le pH naturel du jus de raisin, c'est-à-dire le pH 3, qui soit le plus favorable à la synthèse de la thiamine et le plus défavorable à sa consommation. En outre, une particularité des vins de pH 2 réside dans le fait que la thiamine qu'ils renferment s'y trouve en presque totalité, 60 à 90 p. 100, sous forme d'ester pyrophosphorique, c'est-à-dire de cocarboxylase, alors que dans tous les autres vins elle est entièrement sous forme libre. Le pH 2 serait défavorable à l'hydrolyse de la cocarboxylase.

7° *Influence des sels de* NH_4 (tabl. 10).

Des milieux synthétiques et naturels ont été additionnés de : NH_4OH, tartrate et phosphate de NH_4^+ à raison de 500 mg d'azote par litre ; leur pH varie de 3,5 à 3,9.

Si on considère la vitesse de fermentation des milieux synthétiques, la levure privée de thiamine ne réagit que faiblement à l'influence accélératrice des sels ammoniacaux, l'association : thiamine-NH_4 a une action plus forte.

— Milieux synthétiques sans vitamine B_1. Dans tous les essais on trouve des quantités identiques de vitamine B_1, représentant une synthèse normale et uniforme de 20 à 40 µg par litre ; aucune influence ne se manifeste.

— Milieux synthétiques avec vitamine B_1 et jus frais. La présence du cation NH_4 ne favorise nullement la synthèse de la vitamine B_1 ; au contraire, elle donne lieu à une consommation : les vins provenant des jus enrichis en sels ammoniacaux sont moins riches en thiamine que les vins témoins. On n'observe aucune différence significative entre les essais renfermant de l'NH_4OH et les autres sels ammoniacaux.

On retrouve les mêmes résultats que pour les jus ayant fermenté à pH4, c'est-à-dire pour les jus dont la fermentation est accélérée ; dans ces conditions les besoins en thiamine des microorganismes paraissent être accrus. Il semblerait que les sels ammoniacaux agissent ici par l'augmentation qu'ils font subir au pH.

TABLEAU 9

Influence du pH *du milieu sur l'élaboration et l'exsorption de la thiamine*
Jus de raisin frais naturel et ensemencé à raison de $10 \cdot 10^6$ *germes/ml*

	pH 4										
	Élaboration							Exsorption			
	Lies du vin Vit. B_1 µg/l	Vin_t-vit. B_1 µg/l		p. 100 Vit. B_1 libre dans V_t	Total V_t + Lies µg/l	Total sans vit. B_1 de l'ensemencement µg/l	Vit. B_1 élaborée ou consommée µg/	p. 100 perte dans les vins traités	Vit. B_1 Vins 3 mois sur lies		
		Libre	Totale						Libre	Totale	p. 100 Libre
Jus frais	177		18		195	—	— 30	—		120	
pH 4	131		47		178	—	— 4	9		102	
Jus frais + Levure 10	224		18		242	227	+ 2	—		231	
pH 4	182		45		227	212	— 13	6		128	
Jus frais + Levure 183	229		36		265	252	+ 27	—		222	
pH 4	168		27		195	182	— 43	26		145	
	pH 2										
Jus frais	177	18	18	100	195	—	— 30	—	120	120	—
pH 2	5	36	176	20	181	—	— 44	7	40	176	22
Jus frais + Levure 10	224	18	18	100	242	227	+ 2	—	231	231	—
pH 2	10	27	148	18	158	143	— 82	37	33	145	15
Jus frais + Levure 183	229	36	36	100	265	252	+ 27	—	222	222	—
pH 2	33	18	157	11	190	177	— 48	28	16	188	8

Jus de Raisin frais : teneur en thiamine : 255 µg/l — pH = 3,15

TABLEAU 10

Influence des sels ammoniacaux sur l'élaboration et l'exsorption de la thiamine
Jus de raisin frais. Ensemencement à 10 · 10^6 germes/ml. Cation NH_4 à raison de 500 mg/l d'azote

Vitamine B_1 en μg/litre

	Fermentation 1er jour	Lies des vins	Vin *c*	Vin *t*	Total V_t + lies	Total sans vit. B_1 de l'ensemencement	Vit. B_1 élaborée ou consommée	pH des jus	Vins sur lies			
									10 jours	1 mois	4 mois	7 mois
Jus frais naturel	0	467		36	503		+ 103	3,2	33	280	380	370
+ NH_4OH	0	400		36	436		+ 36	3,9	99	253	325	310
+ Phosphate	0	380		59	439		+ 39	3,7	120	287	359	295
+ Tartrate	10	380		22	402		+ 2	3,6	25	277	304	295
Jus frais + levure 10	0	427	80	90	517	495	+ 95		207	480	507	
+ NH_4OH	0	167	172	288	455	433	+ 33		273	414	430	
+ Phosphate	15	190	155	229	419	397	— 3		267	383	397	
+ Tartrate	0	95	213	313	408	386	— 14		380	414	410	
Jus frais + levure 183 P_c	10	455		22	477	451	+ 51		25	164	237	254
+ NH_4OH	0	239		0	239	213	— 187		4	110	152	135
+ Phosphate	0	307		0	307	281	— 119		4	130	181	175
+ Tartrate	0	280		0	280	254	— 146		12	110	193	150

Teneur en thiamine du jus de raisin frais : 400 μg/l.

8° *Influence de l'aération pendant la fermentation* (tabl. 11).

— Milieu synthétique sans thiamine. L'aération provoque ici une synthèse très importante de thiamine. Alors qu'en anaérobiose l'élaboration ne dépasse pas 50 µg par litre, en aérobiose elle s'élève entre 150 et 300 µg par litre.

TABLEAU II

Influence de l'aération sur l'élaboration de la thiamine
Milieux synthétiques avec et sans thiamine. Levure 10.

Thiamine (µg/l) Ensemencement 10^6 germes/ml	Levures 10^6 ml	Lies des vins (µg/l)	Vin t (µg/l)	Total V_t + Lies (µg/l)	Total sans ensemencement (µg/l)	Vit. B_1 élaborée ou consommée (µg/l)	Vit. B_1 dans 10^{10} levures
Série non agitée							
1 — 0 µg/l — 2	81	5	25	30	25	+ 25	3
2 — 0 µg/l — 2	79	10	20	25	30	+ 25	3
3 — 0 µg/l — 10	122	10	25	35	10	+ 10	0,8
4 — 100 µg/l — 2	71	10	78	88	83	— 17	12
5 — 400 µg/l — 2	84	10	319	329	324	— 76	38,5
6 — 800 µg/l — 2	71	15	607	622	617	— 183	87
Série agitée							
1 — 0 µg/l — 2	450	284	15	300	295	+ 295	6,5
2 — 0 µg/l — 2	350	305	10	315	310	+ 310	8,8
3 — 0 µg/l — 10	350	358	44	402	377	+ 377	11
4 — 100 µg/l — 2	310	348	20	368	363	+ 263	12
5 — 400 µg/l — 2	280	360	49	409	404	+ 4	14,5
6 — 800 µg/l — 2	260	554	13	567	562	— 238	21,5

— Milieux synthétiques avec thiamine. Dans les essais enrichis de doses croissantes de thiamine, la forte élaboration de ce corps observée pour de faibles concentrations diminue d'intensité et fait place à une consommation qui va en s'accentuant au fur et à mesure que l'enrichissement au départ a été élevé. On retrouve les mêmes résultats qu'en anaérobiose, mais avec une amplitude bien plus grande et un décalage.

— Milieu naturel. L'influence de l'aération se manifeste beaucoup moins dans le jus de raisin frais et se manifeste de façon irrégulière. Dans le jus de raisin, qui est un milieu très complexe, les effets de l'aération sont peut être contrariés par certains éléments qu'il renferme en quantités plus ou moins grandes.

Ces résultats montrent que les levures sont capables d'une synthèse totale et importante de thiamine sans l'apport de précurseurs complexes particuliers, avec seulement les corps qui figurent dans un milieu fermentaire le plus simple possible. On peut penser que l'aérobiose active la synthèse des enzymes responsables de l'élaboration des précurseurs de la thiamine (Ournac, 1970).

9° *Influence de l'anhydride sulfureux* (tabl. 12).

Le SO_2 est ajouté sous forme gazeuse à raison de 50 et 100 mg par litre, quantités qui correspondent à celles utilisées en vinification.

TABLEAU 12

Influence du SO_2 du milieu sur l'élaboration de la thiamine. Jus de raisin frais. Ensemencé à raison de $10 \cdot 10^6$ germes/ml

	Vit. B_1 du jus frais µg/l	Lies des vins Vit. B_1 µg/l	Vin *t* Vit. B_1 µg/l	Total V_t + Lies µg/l	Total sans Vit. B_1 de l'ensemble µg/l	Vit. B_1 p. 100 de reste	SO_2 mg/l dans les vins	Vins sur lies Vit. B_1 µg/l		
								1 mois	3 mois	6 mois
Jus frais naturel	180	180	9	189	—	—	—			
+ 50 mg/l SO^2		72	9	81	—	43	13			
+ 100 —		90	9	99	—	52	56			
Jus frais + Levure 10		54	144	198	183	—	—			
+ 50 mg/l SO^2		18	81	100	85	46	8			
+ 100 —		108	9	117	102	56	67			
Jus frais + Levure 183		153	27	180	168	—	—			
+ 50 mg/l SO^2		99	9	108	96	60	5			
+ 100 —		90	9	100	88	55	30			
Jus frais naturel	360	257	44	301	—	—		207	290	270
+ 50 mg/l SO^2		214	27	241	—	80	11	103	163	144
+ 100 —		207	27	234	—	78	40	103	137	114
Jus frais + Levure 10		248	88	336	316	—		180	260	334
+ 50 mg/l SO^2		140	44	184	164	52	15	114	137	125
+ 100 —		190	18	208	188	59	35	97	137	114
Jus frais naturel	280	207	151	358	—	—	—		350	
+ 50 mg/l SO^2		80	0	80	—	22	8		37	
+ 100 —		64	0	64	—	18	60		28	
Jus frais + Levure 10		326	16	342	328	—	—		314	
+ 50 mg/l SO^2		120	0	120	106	32	0		65	
+ 100 —		74	0	74	60	18	44		28	

Il est très difficile aux milieux synthétiques d'entrer en fermentation lorsqu'ils sont additionnés de SO_2, même à ces faibles doses, nous n'avons pu réussir qu'un seul essai. Dans les jus frais, même levurés, le SO_2 retarde de 1 à 2 jours le départ de la fermentation.

Lorsque la fermentation se produit en présence de SO_2, on assiste dans tous les cas à des pertes de thiamine d'importance très variable, mais jamais totales et qui, de plus, ne sont pas toujours proportionnelles à la dose de SO_2 présente. Le comportement de la thiamine en présence de SO_2 varie surtout avec le jus considéré ; pour les différents jus de raisins étudiés les pertes s'échelonnent entre 20 et 80 p. 100 ; elles sont très faibles pour les jus synthétiques, 10 p. 100 seulement environ. Ces variations entre les différents jus de raisins identiquement sulfités montrent que le SO_2 agit en concurrence avec d'autres facteurs présents dans les jus en plus ou moins grande quantité. Les levures ajoutées n'influent pas sur l'action du SO_2.

Pendant la conservation des vins sur lies, qui se produit en présence de quantités de SO_2 bien inférieures à celles ajoutées aux jus, une partie seulement de la thiamine des levures se retrouve dans le vin, sa destruction se poursuit.

De toute façon, les vins provenant de moûts sulfités peuvent renfermer des proportions notables de la thiamine présente dans les jus d'origine.

3. — *Exsorption de la thiamine*

On a voulu déterminer, d'une part, la vitesse d'exsorption par la levure de la thiamine qu'elle renferme, d'autre part l'importance de cette exsorption. Pour cela nous avons effectué plusieurs déterminations.

Le premier test relatif à la rapidité de rejet de la thiamine dans le vin est constitué par l'évaluation de la richesse du vin clair V_c, c'est-à-dire du vin prélevé dès la fin de la fermentation.

Le deuxième test est la détermination de la quantité de vitamine rejetée par les levures au cours d'un simple brassage des lies ; pour cela on compare la teneur du vin clair, V_c, à celle du vin obtenu après remise des lies en suspension et centrifugation immédiate, soit V_t.

Après cette première agitation, les vins sont conservés au contact des lies et des dosages réguliers sont effectués sur le vin clair surnageant, les dépôts étant remis en suspension après chaque dosage.

D'autre part, une série de vins a été maintenue sur lies mais sans agitation entre les prélèvements.

Il faut tout d'abord signaler que des dosages de vitamines réalisés quelques jours avant la fin de la fermentation sur les vins centrifugés ont toujours indiqué une absence totale de thiamine ; en aucun cas la restitution de ce corps dans le milieu liquide ne commence avant la fin complète de la fermentation. D'autre part, l'arrêt exact de l'activité fermentaire de la levure n'étant pas possible à saisir, on peut dire que le vin V_c a été prélevé entre 0 et + 2 ou + 3 jours après cet arrêt ; sa valeur vitaminique peut varier selon le moment du prélèvement mais nous renseignera sur la rapidité de l'exsorption à partir de l'instant où toute activité fermentaire de la levure a cessé.

1° *Influence de l'agitation pendant la conservation du vin sur lies* (tabl. 13).

Le rejet de la thiamine par les levures sédimentées non agitées se réalise tout de même, mais plus lentement que par les levures remises en suspension à intervalles réguliers et reste toujours inférieur à ce dernier. Le brassage vin-lies active l'exsorption et la rend plus quantitative. Dans un cas cependant, cas d'une levure caractérisée comme « lente », la levure 4, aucune restitution ne s'est produite dans l'essai n'ayant pas été agité.

2° *Influence du brassage des lies.*

Le rejet de la thiamine au cours d'un simple brassage des levures dans le vin fini, représenté par la différence entre V_t et V_c, est insignifiant dans la plupart des cas. Seule la levure 10, signalée comme ayant un pouvoir rapide d'exsorption, laisse diffuser des quantités considérables de thiamine au cours de cette opération.

L'exsorption dans ces conditions se manifeste avec des levures riches en thiamine, soit qu'elles proviennent d'un inoculum important ou de forte teneur en thiamine, soit qu'elles aient évolué dans un milieu fermentaire fortement enrichi en thiamine.

3° *Influence de l'importance de l'ensemencement* (tabl. 6).

D'une façon générale, lorsque le jus de raisin a été ensemencé la restitution de la thiamine dans le vin est plus rapide que lorsque le jus a fermenté avec la flore naturelle du raisin. L'exsorption est d'autant plus rapide que l'ensemencement au départ a été plus fort. Plus l'inoculum est important et plus les valeurs de V_c et V_t sont élevées.

4° *Influence de la levure* (tabl. 1 et 2).

La vitesse de restitution dans le vin de la thiamine que renferment les levures varie avec la levure utilisée. Certaines levures sont beaucoup plus rapides que d'autres et cela se retrouve avec les trois tests précédemment indiqués : valeurs de V_c et V_t, différence entre V_t et V_c et courbe d'exsorption. La levure 10, par exemple, est « rapide », alors que la levure 4 est « lente », ainsi que la 4 P_c. De toute façon, dans tous les cas, la restitution est réalisée de 75 à 100 p. 100 en trois mois maximum.

5° *Influence du milieu.*

La restitution de la thiamine dépend certainement de la composition du milieu ; dans les milieux naturels elle est beaucoup plus rapide que dans les milieux synthétiques, et elle varie aussi d'un milieu naturel à un autre.

6° *Influence de la teneur en thiamine du milieu fermentaire* (tabl. 3 et 4).

Plus le milieu fermentaire est riche en thiamine, plus la levure en renferme au terme de la fermentation, puisqu'elle absorbe toute celle qui est à sa disposition dès le début de son activité, et plus rapidement elle la rejette. En effet, les vins *t* sont d'autant plus riches en thiamine que les jus d'origine l'étaient. Le passage de la thiamine au cours de l'homogénéisation est d'autant plus important que la teneur du jus est élevée, comme nous l'avons vu paragraphe 2. Les courbes de l'exsorption dans le temps confirment ces résultats (fig. 1).

Dans les cas de fortes teneurs initiales en thiamine, la restitution peut ne pas être quantitative ; une légère retention se produit pour certaines levures.

TABLEAU 13

Influence de l'agitation des lies dans le vin sur l'exsorption de la thiamine. Jus de raisin frais. Ensemencement à 10 · 10⁶ /ml

	Vit. B_1 totale V_t + Lies µg/l	Vit. B_1 V_c µg/l	Vit. B_1 V_t µg/l	Vins sur lies — Vit. B_1 en µg/l							p. 100 de restituton à 3 mois
				8 jours	15 jours	21 jours	1 mois	2 mois	3 mois	6 mois	
Lies agitées pendant la conservation des vins											
Jus naturel	197	0	0	0	17	50	108	180	195	190	96
+ Levure 10	225	26	52	176	217	215	216	223	220	220	98
+ Levure 183	235	0	0	0	75	163	225	225	230	230	98
+ Levure 4	190	0	50	190	130	170	175	180	185	180	95
+ Levure 10 + Vit. B_1 .	1 120	377	787	1 028	1 034	1 040	1 063	1 060	1 030	1 054	94
Lies non agitées pendant la conservation des vins											
Jus naturel		0		0	34	74	135	170	180	190	91
+ Levure 10		30		102	167	187	190	180	187	190	84
+ Levure 183		0		0	42	140	190	190	185	190	81
+ Levure 4		0		0	0	0	0	0	2	20	0
+ Levure 10 + Vit. B_1 .		500		945	920	990	1 020	1 000	1 000	990	88

Teneur en thiamine du jus frais : 185 µg/l
— — jus enrichi : 1 200 µg/l

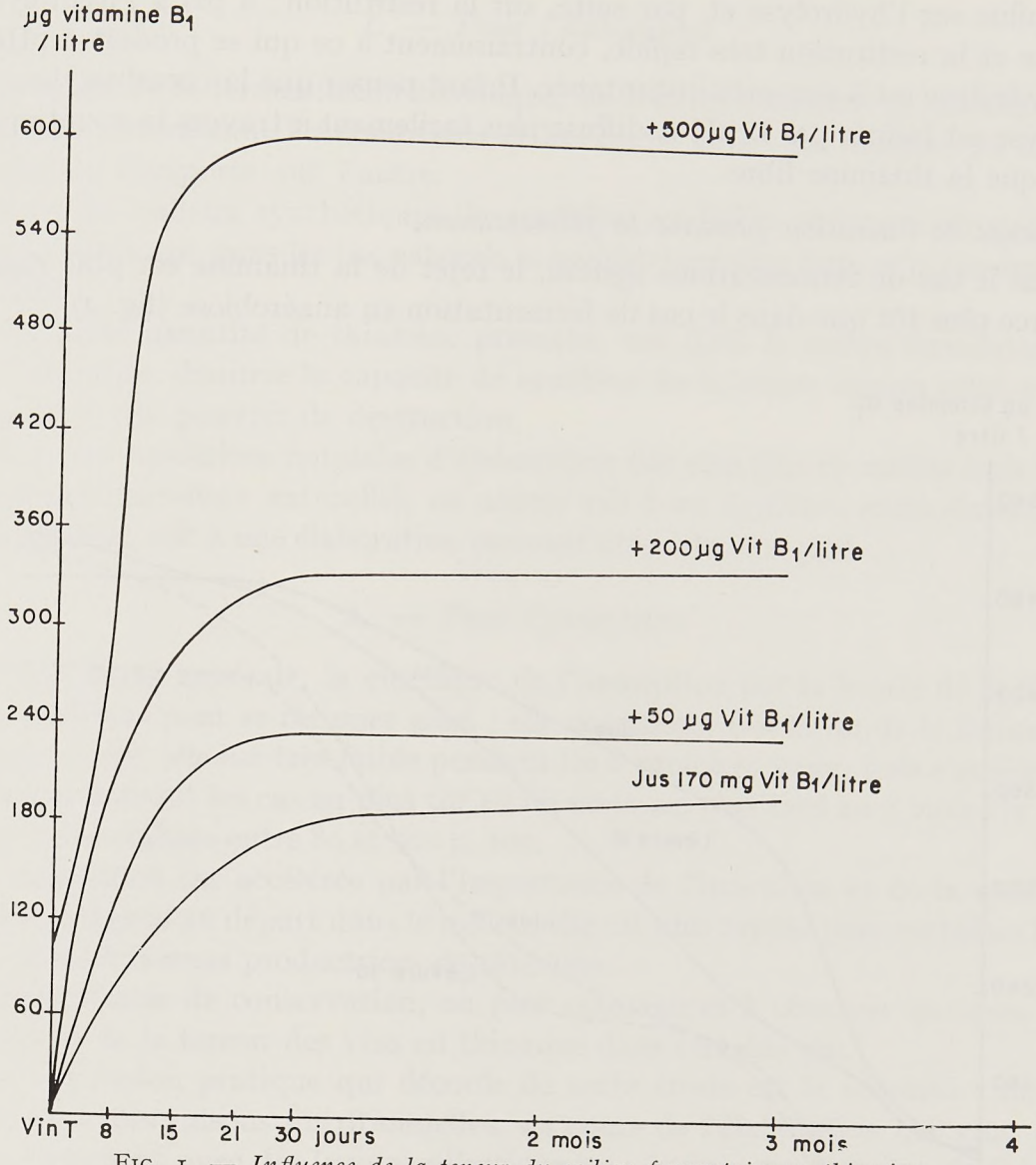


FIG. 1. — *Influence de la teneur du milieu fermentaire en thiamine sur son exsorption par la levure*

Jus de raisin frais renfermant 170 µg vit B1/litre

7° Influence du pH du milieu.

A pH 4, l'exsorption est normale, elle est identique à celle des vins témoins.

A pH 2, l'exsorption est très rapide, elle est pratiquement réalisée durant les 2 ou 3 premiers jours qui suivent la fin de la fermentation, le vin *t* renferme déjà la presque totalité de la thiamine du milieu et les lies correspondantes en sont à peu près dépourvues. Mais cette thiamine du vin *t* se trouve en grande partie, 80 à 90 p. 100, sous forme d'ester pyrophosphorique ou cocarboxylase comme nous l'avons déjà vu. Au cours de la conservation du vin, cet ester s'hydrolyse jusqu'à une certaine limite ; au bout de 3 mois, l'hydrolyse ne s'est pratiquement pas manifestée et dans certains essais au bout de 14 mois le 1/4 de la thiamine présente se trouve encore sous forme de cocarboxylase.

Généralement, pendant la fermentation la thiamine est localisée totalement à l'intérieur des cellules de levure et entièrement sous forme d'ester phosphorique ; dès la fin de la fermentation elle est libérée par la levure sous forme de thiamine libre, elle doit être hydrolysée au fur et à mesure de sa libération dans le vin. Le pH du

milieu influe sur l'hydrolyse et, par suite, sur la restitution ; à pH 2 l'hydrolyse est très lente et la restitution très rapide, contrairement à ce qui se produit à pH 3 ou 4 où l'hydrolyse est à peu près instantanée. Il faut penser que la cocarboxylase, dont l'hydrolyse est freinée par le pH 2, diffuse plus facilement à travers la membrane des levures que la thiamine libre.

8° *Influence de l'aération pendant la fermentation.*

Dans le cas de fermentations agitées, le rejet de la thiamine est plus rapide et commence plus tôt que dans le cas de fermentation en anaérobiose (fig. 2).

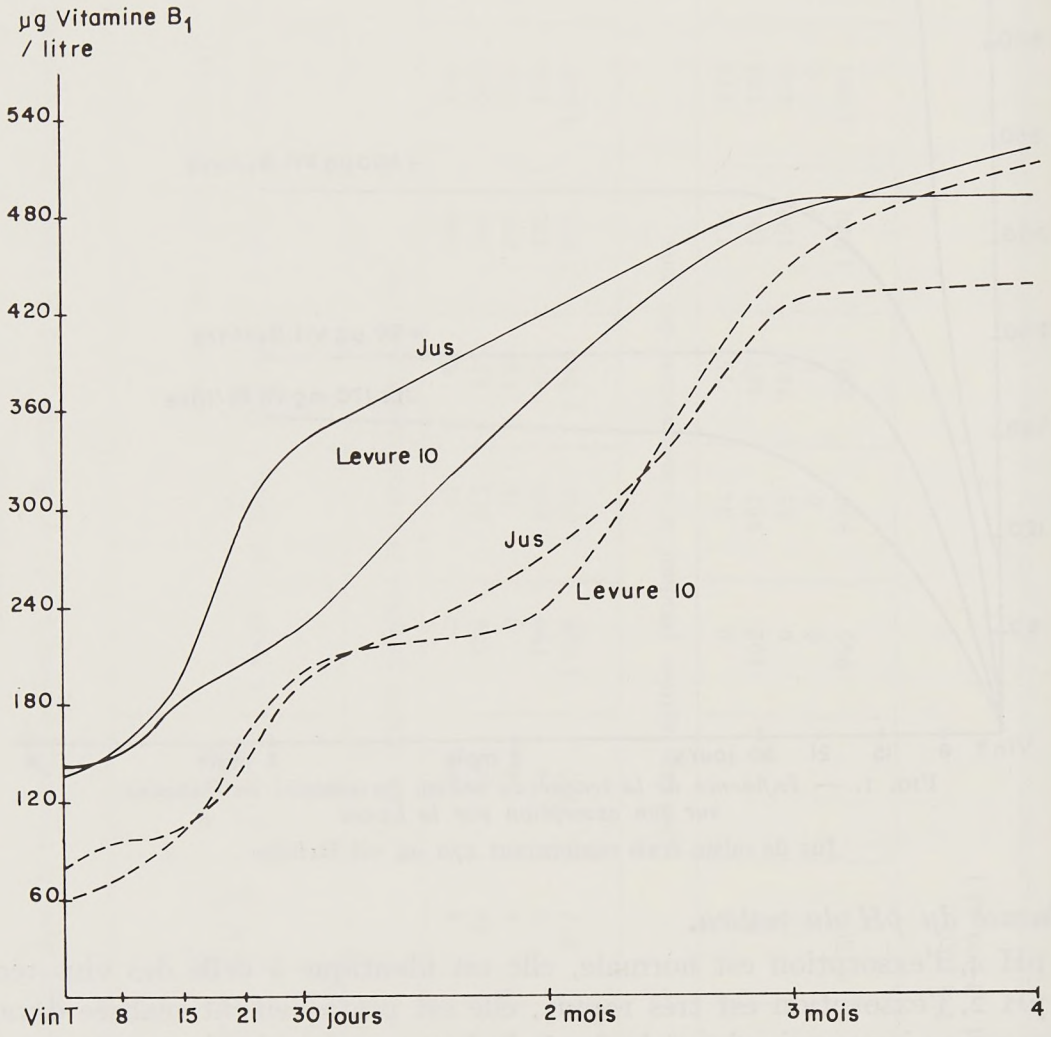


FIG. 2. — *Influence de l'agitation pendant la fermentation sur l'exsorption de la thiamine par la levure*

Jus de raisin frais renfermant 370 µg Vit B1/litre

——— Série agitée
- - - - - Série non agitée

CONCLUSION

On a considéré, d'une part, le pouvoir d'élaboration de la thiamine par la levure pendant la fermentation et d'autre part la capacité d'exsorption dans le milieu liquide. Voici ce qui ressort de cette étude :

1. — *Pour l'élaboration*

Au cours de la fermentation alcoolique, les levures élaborent et consomment de la thiamine, et suivant les conditions et la souche de levure utilisée, un des deux phénomènes l'emporte sur l'autre.

Dans les milieux synthétiques, la synthèse est faible et la consommation importante, alors que dans les jus naturels la synthèse est plus forte et la consommation plus faible.

Une forte quantité de thiamine présente, soit dans le milieu fermentaire, soit dans l'inoculum, diminue la capacité de synthèse de la levure envers cette vitamine et augmente son pouvoir de destruction.

Dans les conditions normales d'élaboration des vins (jus de raisins frais fermentant avec sa microflore naturelle), on assiste soit à un équilibre entre élaboration et consommation, soit à une élaboration pouvant atteindre 100 µg/l.

2. — *Pour l'exsorption*

D'une façon générale, la cinétique de l'exsorption par la levure de la thiamine qu'elle renferme peut se résumer ainsi : elle commence dès la fin de la fermentation et jamais avant, elle est très faible pendant les 8 premiers jours, puis s'accélère pour se terminer suivant les cas au plus tôt en un mois, au plus tard en 3 mois ; la restitution est alors réalisée entre 80 et 100 p. 100.

L'exsorption est accélérée par l'importance de l'inoculum et de la quantité de thiamine présente au départ dans le milieu, elle est plus rapide pour certaines levures, celles qui sont bonnes productrices de thiamine.

Après 6 mois de conservation, on peut commencer à observer quelques légères diminutions de la teneur des vins en thiamine dans certains cas.

La conclusion pratique qui découle de cette étude est la suivante : on aurait intérêt, pour des raisons nutritionnelles, au cours de l'élaboration des vins, à ensemencer fortement avec des levures sélectionnées « bonnes productrices de thiamine » et pauvres en thiamine, c'est-à-dire ayant proliféré dans un milieu en renfermant très peu.

Reçu pour publication en juillet 1970.

SUMMARY

CONDITIONS FOR THE ELABORATION AND DESORPTION OF THIAMINE BY YEAST

Factors favourable to the elaboration and desorption of thiamine by yeast during and after alcoholic fermentation were determined.

The influence of the following factors was studied : yeast strain, thiamine content of the medium and the inoculum, extent of the inoculation, amount of sugar in medium, pH, ammonium salts, aeration and SO_2.

Tests are carried out simultaneously on the synthetic medium and on fresh grape juice. It was shown that :

— the greater the thiamine content in the inoculum or fermenting medium, the less the yeast yields thiamine and, above certain doses, even consumes some ;

— the higher the fermentable sugar content in the medium, the lower thiamine content in the wine ; the yeast uses thiamine throughout its fermentative activity;

— the pH of fresh grape juice would promote most the synthesis of thiamine by yeast ; a lower pH activates desorption ;

— aeration, especially in a synthetic medium lacking in thiamine, induces a significant build up, showing that yeast is capable of total synthesis ;

— desorption is usually completed, with or without putting the lees into suspension, after 3 months' storage ;

— the higher the thiamine content in the medium and inoculum, the faster is desorption.

RESUMEN

CONDICIONES DE ELABORACIONY DE EXSORPCION DE LA TIAMINA POR LA LEVADURA

Se determinan los factores que pueden favorecer la elaboración y la exsorpción de la tiamina por la levadura y después de la fermentación alcohólica.

Se ha estudiado la influencia de los factores siguientes : raza de levadura, porcentaje de tiamina en el medio y en el inoculum, importancia de la siembra, riqueza en azúcar del medio, pH, sales amoniacales, aereación, SO_2.

Los ensayos son realizados simultáneamente en medio sintético y en zumo de uva fresco. Las comprobaciones han sido las siguientes :

— Cuanto más ricos en tiamina son el inoculum o el medio de fermentación, menos elabora la levadura y, a partir de ciertas dosis, menos consume ;

— Cuanto más rico en azúcar fermentescible es el medio, más pobre en tiamina será el vino y durante el transcurso de su actividad de fermentación la levadura « usa » la tiamina ;

— El pH del zumo de uva fresco parece ser más favorable para la síntesis de la tiamina por la levadura, produciéndose una activación de la restitución por un pH más reducido ;

— La aereación, sobre todo en medio sintético privado de tiamina, provoca una fuerte elaboración, lo cual demuestra que la levadura es capaz de una síntesis total ;

— La exsorpción, con o sin reposición de heces en suspensión, queda generalmente terminada al cabo de tres meses de conservación ;

— La exsorpción es tanto más rápida cuanto más ricos en tiamina son el medio y el inoculum.

RIASSUNTO

CONDIZIONI D'ELABORAZIONE E DI RIMESSA DELLA TIAMINA CON IL LIEVITO

Per mezzo del lievito si determinano i fattori che possono favorire l'elaborazione e la rimessa della tiammina durante e dopo la fermentazione alcolica.

Si è studiata l'influenza dei seguenti fattori : razza del lievito, tenore in tiammina del mezzo e dell'inoculo, importanza dei microbi depositati, ricchezza in zucchero del mezzo, pH, sali ammoniacali, aerazione, SO_2.

Le prove sono effettuate simultaneamente in mezzo sintetico e con succhi d'uva fresca. Ecco cosa si è constatato :

— Tanto più l'inoculo o il mezzo di fermentazione sono ricchi in tiammina, tanto meno il lievito ne elabora e a partire da certe dosi esso ne consuma ;

— Tanto più il mezzo è ricco in zucchero fermentescibile, tanto più il vino è povero in tiammina ; durante la sua attività di fermentazione il lievito « usa » della tiammina ;

— Il pH del succo d'uva fresca sarebbe il più favorevole alla sintesi della tiammina per mezzo del lievito ; un pH più basso attiva la restituzione ;

— L'aerazione soprattutto in mezzo sintetico privo di tiammina, provoca una forte elaborazione e mostra cosi' che il lievito è capace di una sintesi totale ;

— La rimessa, con le fecce riposte o no in sospensione, finisce generalmente dopo 3 mesi di conservazione ;

— La rimessa è tanto più rapida quanto più il mezzo e l'inoculo sono ricchi in tiammina.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ASCHKENASY-LELU P., 1960. L'alcoolisation chronique expérimentale. Influence exercée par divers facteurs physiologiques sur la consommation spontanée d'alcool chez les animaux de laboratoire. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **14**, 101-133.

CAUSERET J., 1953. Les vitamines dans l'alimentation humaine. *Bull. Soc. sci. Hyg. aliment.*, **41**, 133-148.

FINK H., JUST F., 1941, 1942. The vitamin B_1 content of various yeasts and method of increasing it. *Biochem. Z.*, **308**, 15-28 ; **311**, 61-72.

GENUNG E. F., LEE M. E., 1944. Studies on the synthesis of thiamin by certain strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **47**, 434-435.

LAFON-LAFOURCADE S., BLOUIN J., SUDRAUD P., PEYNAUD E., 1967. Essais d'utilisation de la thiamine au cours de vinifications expérimentales en vins blancs liquoreux. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **53**, 1046-1051.

LEONIAN L. H., LILLY V. G., 1943. Induced autotrophism in yeast. *J. Bacteriol.*, **45**, 329-339.

LEWIS J. C., STUBBS J. J., NOBLE W. M., 1944. Vitamin synthesis by *Torula* yeast. *Arch. Biochem.*, **4**, 389-401.

ODINSOVA E. N., 1941. Influence de la vitamine B_1 sur la capacité de fermentation des microorganismes. *Mikrobiologija* (Moscou), **10**, 670-687.

OURNAC A., FLANZY M., 1957. Localisation et évolution de la vitamine B_1 dans le raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **6**, 257-292.

OURNAC A., FLANZY M., 1967. Enrichissement en vitamine B_1 des vins conservés au contact des lies. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 41-54.

OURNAC A., 1969. Influence de l'origine de la thiamine (levure ou milieu) sur la vitesse de la fermentation alcoolique. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 187-198.

OURNAC A., 1970. Synthèse et couplage des deux constituants de la thiamine par la levure. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 5-16.

PARKHOMENKO Y. M., CHAGOVETS R. V., 1967. Effect of thiamin content in the cultural medium of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, on its adsorption and synthesis. *Ukrain. biokhim. Zh.*, **39**, 438-443.

PAVCEK P. L., PETERSON W. H., ELVEHJEM C. A., 1937. Effect of growth conditions of yield and vitamin B_1 of yeast. *Industr. engng. Chem.*, **29**, 536-541.

PAVCEK P. L., PETERSON W. H., ELVEHJEM C. A., 1938. Factors affecting the vitamin B_1 content of yeast. *Industr. engng. Chem.*, **30**, 802-805.

SCHEUNERT A., WAGNER K. H., FINK H., KREBS J., 1939. Synthesis of vitamin B_1 and B_2 (complexe) by the yeast *Torula utilis*. *Biochem. Z.*, **302**, 1-11.

SCHULTZ A. S., ATKIN L., 1947. The utility of bios response in yeast classification and nomenclature. *Arch. Biochem.*, **14**, 369-380.

SILVERMAN M., WERKMAN C. H., 1939. Adaptation of the propionic acid bacteria to vitamin B_1 synthesis including a method of assay. *J. Bacteriol.*, **38**, 25-32.

TRÉMOLIERES J., LOWY R., GRIFFATON G., 1967. Physiologie de l'oxydation et de l'utilisation de l'éthanol à doses normales et toxiques. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21**, 69-103.

VAN LANEN J. M., BROQUIST H. P., JOHNSON M. J., BALDWIN I. L., PETERSON W. H., 1942. Synthesis of vitamin B_1 by yeast. *Industr. engng. Chem.*, **34**, 1244-1247.

VAN LANEN J. M., TANNER F. W., 1948. Vitamins in microorganisms. Distribution and quantitative synthesis. *Vitamins and hormones*, **6**, 164-173.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (4), 311-321.

SÉPARATION DES PROTÉINES SOLUBLES DE DIVERS FRUITS. MISE EN ÉVIDENCE D'ENZYMES A ACTIVITÉ AMYLOLYTIQUE

J.-C. PECH, C. BARDET et J. FALLOT

Laboratoire de Biologie végétale,
École nationale supérieure agronomique, 145, Avenue de Muret, 31 - Toulouse

RÉSUMÉ

Les protéines de fruits mûrs très divers ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les protéinogrammes et les enregistrements densitométriques de ceux-ci présentent de grandes différences.

La détection d'enzymes amylolytiques en gel a permis de montrer que leur nombre varie essentiellement selon l'espèce de fruit considérée. Aucune, par exemple, n'a été décelée dans le raisin alors qu'il en existe 3 à 5 chez les pommes et les poires.

INTRODUCTION

Si la composition en protéines des plantes a fait l'objet de nombreux travaux, celle des fruits n'a été que rarement étudiée. C'est ainsi que les revues récentes concernant le métabolisme des fruits ne mentionnent que très sommairement ces composés, la plupart des recherches portant sur l'activité enzymatique d'extraits de tels organes (Biale, 1960 ; Kefford, 1959 ; Hansen, 1966 ; Ulrich et Hartmann, 1967). Ceci tient aux difficultés rencontrées lors de l'extraction et de la séparation des protéines et dues, notamment, à la présence de polyosides et de composés phénoliques. Ces difficultés sont d'autant plus grandes que la teneur en protéines des fruits est extrêmement faible. La plupart des autres organes végétaux, tels que les feuilles ou les grains, sont par comparaison beaucoup plus riches (tabl. 1).

Les premiers travaux effectués sur la séparation des protéines des fruits en gel de polyacrylamide sont dus à Clements (1965) qui a proposé l'utilisation d'acétone pour l'élimination des composés phénoliques. Les méthodes fondées sur ce principe sont aujourd'hui délaissées par certains auteurs, car elles présentent divers inconvénients et sont difficiles à mettre en œuvre (Anderson, 1968).

Nous avons été ainsi conduits à mettre au point une technique d'extraction et de séparation des protéines de poires par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Pech, Bardet et Fallot, 1970 *a*).

Il importait alors de savoir si le champ d'application de la méthode proposée pouvait être étendu à des fruits très divers, quant à leur origine botanique, leur composition et leur métabolisme.

TABLEAU I

Teneur en azote protéique de la pulpe de divers fruits, comparée à celle d'autres organes végétaux

Organes mûrs ou adultes	N protéique mg/100 g mat. fraîche	Références
Banane *Gros-Michel* (pulpe)	104,8	Steward *et al.*, 1960
Poire *Passe-Crassane* (pulpe) ...	26,2	Pech, 1970
Pomme *Cox's Orange Pippin* (pulpe)	36,9	Hulme, 1954
Orange (pulpe)	128 *	Biale, 1960
— (graine)	2 200 *	Rockland, 1961
Raisin (pulpe)	128 *	Biale, 1960
Feuille de blé (limbe)	510 *	Moyse, 1950
Blé (graine)	1 400 *	Mossé, 1968

* Calculé à partir des résultats fournis par les auteurs cités.

Il a paru nécessaire, enfin, de chercher à caractériser les protéines ainsi séparées. Dans cette voie, ce sont les enzymes amylolytiques qui ont fait l'objet de nos premiers travaux, car nous avions précédemment abordé le problème de l'amylolyse au sein de pommes dépourvues de graines dans certaines de leurs loges carpellaires (Pech et Fallot, 1968). En outre, les enzymes responsables de l'hydrolyse de l'amidon dans les fruits sont mal connues (Hulme, 1958 ; Ulrich et Hartmann, 1967).

Une meilleure connaissance des enzymes et du mécanisme de leur action après isolement et purification conduirait à des applications technologiques d'un grand intérêt dans le domaine de la conservation et de la transformation des fruits. On sait, par exemple, toute l'importance des enzymes dans les phénomènes de brunissement et d'oxydation, responsables de l'altération des qualités des denrées traitées. On sait aussi que les processus de transformation doivent parfois faire apparaître des caractères favorables, par disparition de produits indésirables ou formation de composés nouveaux. Dans ce domaine, citons seulement les applications que pourraient avoir les recherches métaboliques sur la biogenèse des arômes naturels.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les fruits des espèces et variétés suivantes ont été retenus :

— poires *Doyenné du Comice*, *Alexandrine Douillart* et *Passe-Crassane* ;
— pommes *Golden Delicious* et *Reinette du Canada* ;
— raisin *Gros Vert* ;
— orange *Navel* ;
— banane *Gros-Michel*.

Au moment du prélèvement, tous les fruits avaient acquis après conservation l'état de maturité gustative, sauf le raisin qui avait mûri sur pied. Les analyses ont porté sur la pulpe pour les poires, les pommes, l'orange, la banane et sur la baie dépourvue de pépins pour le raisin.

Après lyophilisation, le matériel végétal est finement broyé dans un mortier en présence d'azote liquide. L'extraction des protéines se fait selon la méthode précédemment décrite (Pech *et al.*, 1970 *a*) à l'aide du milieu suivant : tampon Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M, mercapto-éthanol 10 mM, diéthyldithiocarbamate 10 mM, « Tween 80 » 1 p. 100 (éther dipolyéthylèneglycol de monooléate de sorbitan), additionné de chlorure de calcium. Étant donné la diversité de la composition des fruits, quelques modifications relatives au volume de tampon, à la dose de Ca^{++}, au volume d'extrait déposé, ont dû être apportées à la technique mise au point pour les protéines de poires ; elles sont résumées dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Caractéristiques du tampon d'extraction des protéines selon la nature des fruits

Fruits	Volume de tampon pour 100 mg de poudre lyophilisée (ml)	Volume d'extrait à déposer lors de l'électrophorèse (ml)	Dose de Ca^{++} à ajouter au tampon (M)
Poire	1	0,2	0,05
Pomme ...	1	0,2	0,05
Orange	1	0,2	0,1
Banane	1	0,1	0,2
Raisin	0,5	0,3-0,4	0,1

L'électrophorèse est conduite à 4°C selon la méthode de Davis (1964) sous un voltage de 2,5 mA par tube, pendant 3 heures.

La coloration des protéines se fait au Noir-amido à 1 p. 100 dans l'acide acétique à 7 p. 100 pendant 1 heure, et l'excès de colorant est éliminé par électrophorèse. Les gels sont ensuite photographiés et l'intensité des bandes protéiques appréciée et enregistrée à l'aide du spectro-colorimètre Chromoscan (Joyce) non muni de filtre.

La caractérisation de ces protéines a été entreprise en commençant par les enzymes à activité amylolytique ; celles-ci ont été révélées selon la méthode de Brewbaker *et al.* (1968) : les gels sont immergés dans une solution d'amidon puis colorés à l'iode ; les sites amylolytiques apparaissent sous forme de plages claires.

RÉSULTATS

A. — *Quantité de protéines solubilisées. Effet du calcium*

Toutes les protéines ne sont pas solubilisées à l'aide du milieu d'extraction employé. Dans le cas de la poire *Passe-Crassane*, par exemple, les protéines extraites représentent 59 p. 100 des protéines totales.

La présence de calcium lors de l'extraction provoque une diminution de la teneur en protéines de l'extrait. Cette réduction, pour la poire *Passe-Crassane*, correspond à environ 7,5 p. 100 pour la dose de 0,05 M et 12 p. 100 pour la dose de 0,10 M (tabl. 3).

TABLEAU 3

Influence de différentes doses de chlorure de calcium sur la quantité de protéines (mg N protéique insoluble dans le TCA × 6,25) *contenues dans 1 ml d'extrait*

Doses de $CaCl_2$	0	0,05 M	0,10 M
Quantité de protéines ...	0,67	0,62	0,59

B. — *Protéinogrammes de divers fruits*

Les protéinogrammes de plusieurs fruits seront décrits successivement. Bien qu'ils aient été obtenus dans une même série d'électrophorèse, la distance de migration du front varie selon l'extrait considéré. On sait en effet que la composition de celui-ci influence la vitesse de déplacement des protéines. Mais, pour un même échantillon, le nombre de bandes et leur séquence sont identiques lors d'électrophorèses différentes, les Rf se montrant parfois légèrement variables.

1. *Poires.*

Chez les trois variétés analysées, les gels présentent de nombreuses bandes bien visibles (fig. 1 et 2).

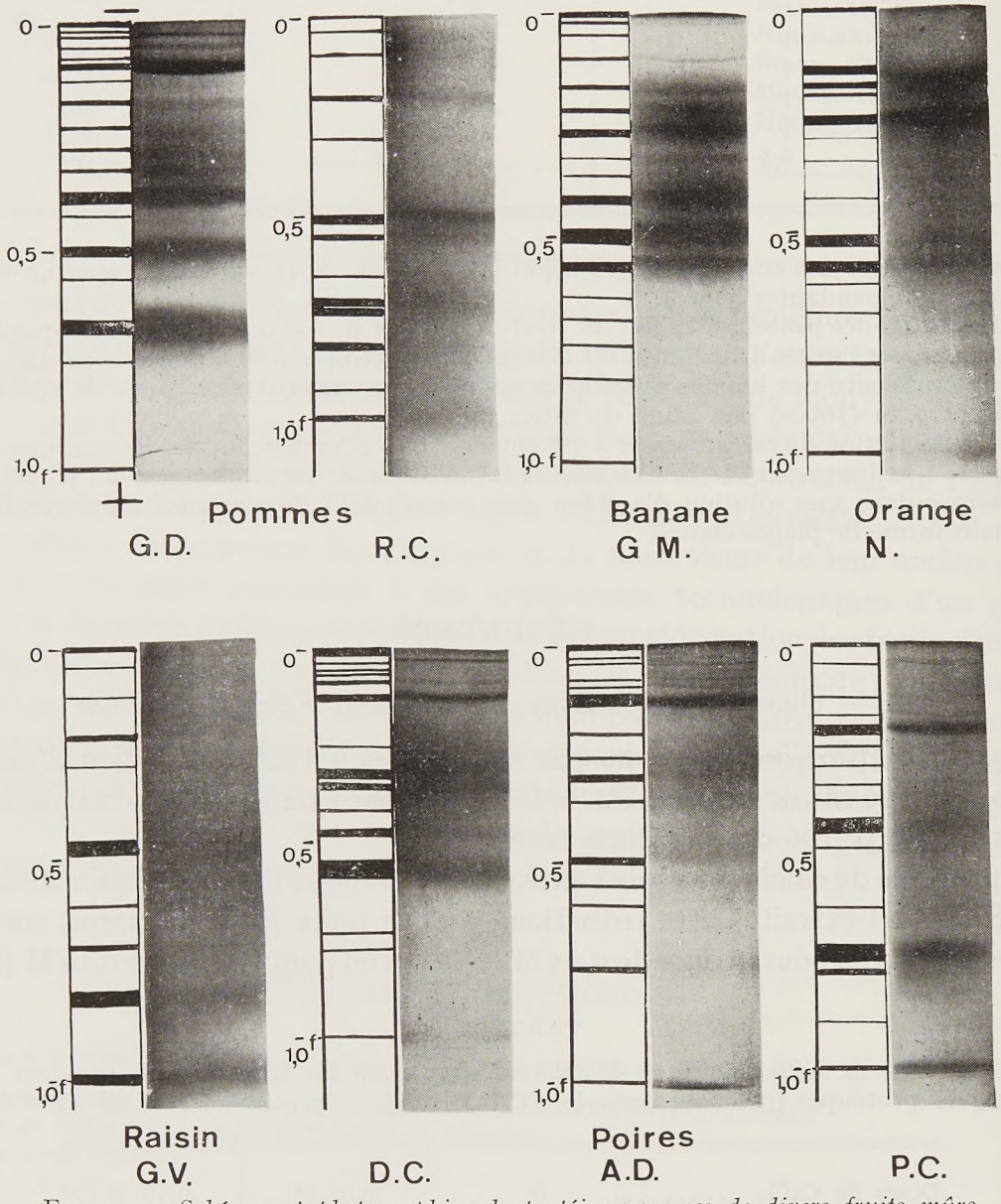


Fig. 1. — *Schémas et photographies de protéinogrammes de divers fruits mûrs, obtenus par électrophorèse en gel de polyacrylamide*
(G. D. : *Golden Delicious* ; R. C. : *Reinette du Canada* ; G. M. : *Gros-Michel* ; N. : *Navel* ; G. V. : *Gros Vert* ; D. C. : *Doyenné du Comice* ; A. D. : *Alexandrine Douillart* ; P. C. : *Passe-Crassane* ; f : front).

Chez la poire *Passe-Crassane* les bandes les plus intenses sont placées à Rf 0,2 ; 0,4 ; 0,7 (fig. 1).

Le protéinogramme de *Doyenné du Comice* possède en particulier quatre bandes très accusées à Rf 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,6.

Pour *Alexandrine Douillart*, les bandes caractéristiques sont d'intensité plus faible (*Rf* 0,1 ; 0,3 ; 0,5).

Les profils électrophorétiques des trois variétés ont une « allure » générale voisine, surtout ceux de *Passe-Crassane* et *Doyenné du Comice*. Il n'est cependant pas possible d'en déduire des analogies plus complètes dans le potentiel protéique de ces fruits.

CLEMENTS (1965) a analysé plusieurs variétés de poires et seule *Bartlett* a donné de bons électrophorégrammes avec un grand nombre de bandes (14). Chez plusieurs autres variétés, les résultats obtenus sont, d'après cet auteur, peu satisfaisants.

La méthode utilisée ici permet d'obtenir de bonnes séparations pour plusieurs variétés autres que celles employées par CLEMENTS. Dans tous les cas, le nombre des bandes bien visibles est toujours égal ou supérieur à 15.

2. *Pommes.*

Les électrophorégrammes de la pulpe de *Golden Delicious* sont très caractéristiques en raison notamment de la présence de quatre bandes très intenses à Rf 0,1 ; 0,4 ; 0,5 et 0,7 (fig. 1 et 2). Dans le cas de cette variété, la résolution obtenue est véritablement excellente.

Quant à la variété *Reinette du Canada*, elle permet d'obtenir des protéinogrammes moins spectaculaires, dont les bandes sont nettement plus faibles (fig. 1). Mais quatre d'entre elles sont très nettes. Des recherches complémentaires sont nécessaires, mais il semble que les analogies entre les protéinogrammes de ces variétés de pommes soient moins grandes que celles observées pour les trois variétés de poires étudiées.

3. *Banane.*

En raison de la présence de grandes quantités de polyosides, la concentration en Ca^{++} du tampon d'extraction a dû être augmentée (tabl. 2). En effet, avec les doses de 0,05 M ou même de 0,1 M, le fond du gel reste sombre et les bandes sont alors peu visibles.

Avec la dose de 0,2 M de Ca^{++}, un grand nombre de bandes peuvent être observées, les plus nettes se situant dans une zone comprise entre Rf 0 et 0,6 (fig. 1 et 2).

4. *Orange.*

Pour cette espèce, la concentration de Ca^{++} a dû être portée à 0,1 M. On sait, en effet, depuis longtemps, que la grande richesse en polyosides de ce matériel rend l'extraction des protéines difficile (SMITH, 1925).

Dans ces conditions, les protéinogrammes sont caractérisés, en particulier, par la présence de trois bandes de plus grande intensité (fig. 1 et 2).

CLEMENTS (1966) a également obtenu de bonnes séparations de protéines de divers fruits de *Citrus*. Les profils densitométriques des protéinogrammes de pulpe d'orange obtenus par cet auteur sont voisins de ceux présentés ici (fig. 2).

5. *Raisin.*

De bons électrophorégrammes (fig. 1 et 2) ont été obtenus moyennant les quelques modifications de méthodes indiquées dans le tableau 2. Toutefois, le fond du gel reste

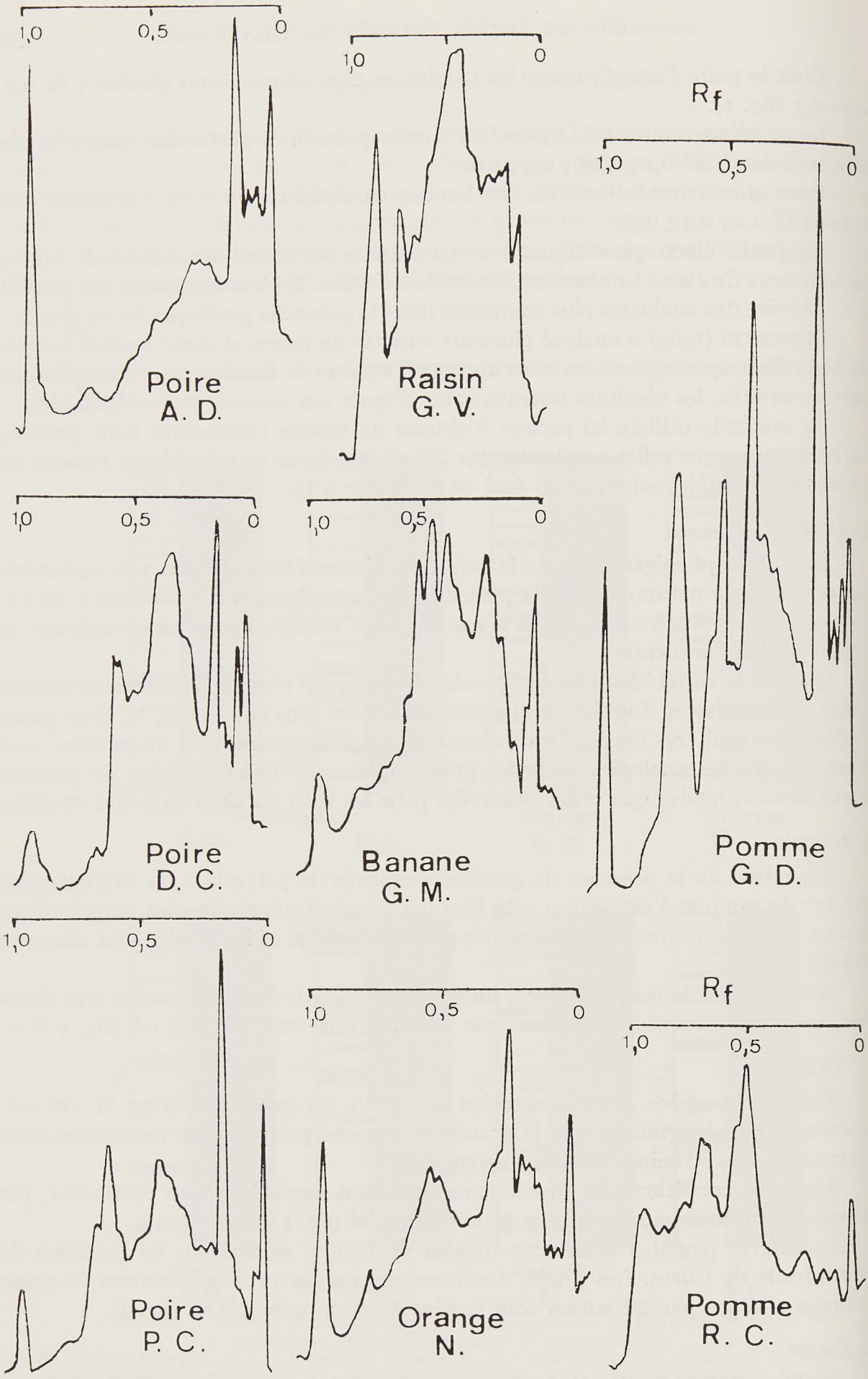


FIG. 2. — *Enregistrements densitométriques de protéinogrammes de différents fruits mûrs, obtenus par électrophorèse en gel de polyacrylamide*
(la signification des sigles correspondant aux variétés est donnée dans la figure 1)

un peu sombre et la concentration en Ca^{++} pourrait sans doute être encore augmentée et passer à 0,15 ou 0,2 M. Dans ce fruit, les trois bandes les plus intenses possèdent des Rf de 0,5 ; 0,8 ; 1,0. Il est à noter que BAYLY et BERG (1967), dans divers jus de raisin, ont séparé 4 à 5 fractions protéiques par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

C. — *Mise en évidence d'enzymes à activité amylolytique*

Parmi les fruits choisis, les uns possèdent des quantités importantes d'amidon à certaines périodes de leur vie (banane, pomme et poire), alors que d'autres n'en contiennent que des traces (orange et raisin). Dans les fruits mûrs, tels que ceux analysés ici, l'amidon a totalement ou presque totalement disparu (banane, BARNELL, 1943 ; poire et pomme, HULME, 1958 ; orange, SINCLAIR, 1961 ; raisin, RIBÉREAU-GAYON, 1966). Le métabolisme glucidique étant différent dans ces divers fruits, il était intéressant de rechercher la présence éventuelle d'enzymes amylolytiques.

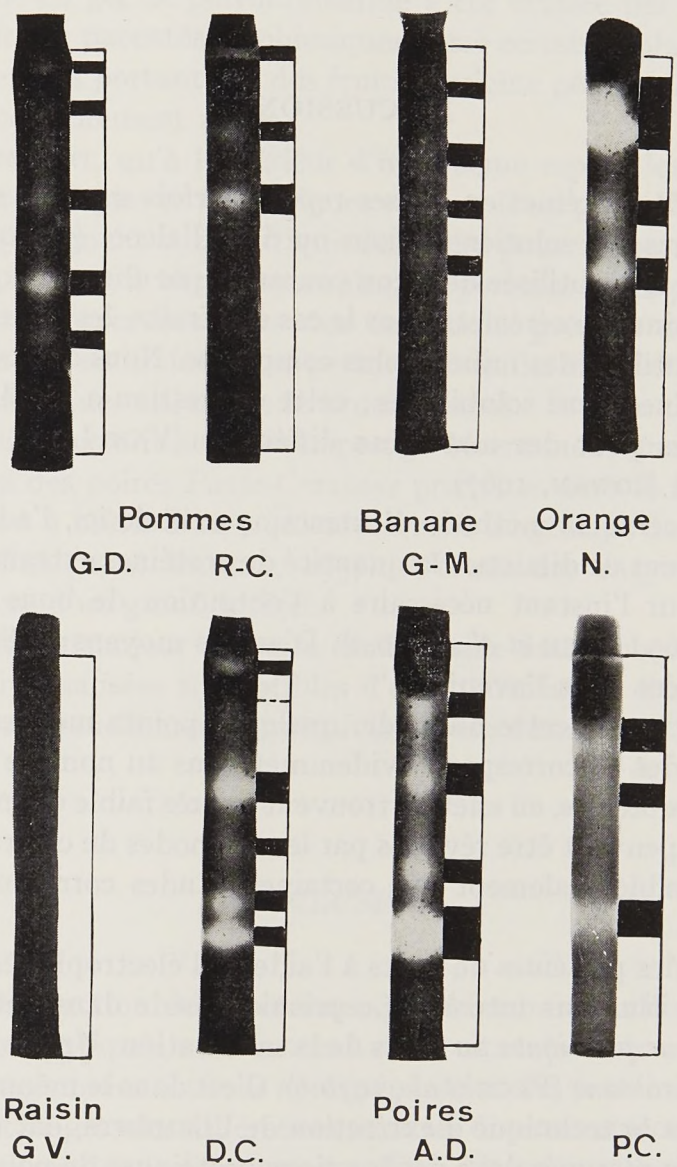


FIG. 3. — *« Zymogrammes » d'enzymes amylolytiques de différents fruits mûrs obtenus après électrophorèse en gel de polyacrylamide, incubation dans une solution d'amidon et révélation à l'iode.*

Sur les photographies, les plages claires correspondent aux sites amylolytiques représentés en noir sur les schémas. La signification des sigles relatifs aux variétés est donnée dans la figure 1

Parmi tous les fruits qui ont fait l'objet d'analyses, seul le raisin *Gros Vert* ne présente aucune activité amylolytique décelable (fig. 3). L'utilisation de plus grandes quantités d'extrait pour l'électrophorèse conduit aux mêmes résultats. Il est possible, toutefois, qu'au cours de la croissance de la baie une telle activité puisse être décelée.

Par contre, dans l'orange qui ne contient jamais, comme le raisin, de grandes quantités d'amidon, une intense activité amylolytique est observée. Trois enzymes sont en effet présentes dont une particulièrement importante à Rf 0,2 (fig. 3).

En ce qui concerne la banane, qui peut renfermer jusqu'à 20 p. 100 de son poids frais en amidon (BARNELL, 1940), trois sites amylolytiques sont présents, tous situés dans la zone comprise entre Rf 0 et Rf 0,6 (fig. 3).

Dans le cas des pommes et des poires, au contraire, les « zymogrammes » présentent toujours des plages décolorées dont le Rf est supérieur à 0,6. Ces fruits offrent en outre la particularité de renfermer un nombre d'enzymes en général plus élevé que dans les précédentes espèces.

DISCUSSION

La séparation de protéines en classes repose parfois sur leur solubilité différentielle dans l'eau, dans des solutions salines ou dans l'alcool (OSBORNE, 1924) ; mais une telle distinction n'est utilisée de façon courante que chez quelques organes végétaux tels que les graines de céréales. Dans le cas des fruits, les difficultés d'extraction nous ont amenés à utiliser des milieux plus complexes. Nous avons appelé « protéines solubles » les protéines ainsi solubilisées ; cette expression a d'ailleurs été employée par d'autres auteurs pour des matériaux différents (VAN LOON et VAN KAMMEN 1968 ; ANDERSON et ROWAN, 1967).

En ce qui concerne la méthode d'extraction utilisée ici, l'addition de calcium présente l'inconvénient de diminuer la quantité de protéines extraites. De toute façon, cet élément est pour l'instant nécessaire à l'obtention de bons protéinogrammes (FRENKEL *et al.*, 1969 ; PECH *et al.*, 1970 *a*). D'autres moyens d'éliminer les pectines pourront être utilisées dans l'avenir.

Dans l'application de cette méthode, quelques points méritent d'être précisés. Le nombre des bandes ne correspond évidemment pas au nombre total de protéines solubles. Certaines protéines, en effet, se trouvent en très faible quantité dans l'extrait, de sorte qu'elles ne peuvent être révélées par les méthodes de coloration couramment utilisées. Il est possible également que certaines bandes correspondent à plusieurs protéines.

La séparation des protéines de fruits à l'aide de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide présente plusieurs intérêts. Le premier réside dans l'étude de l'*évolution de différentes fractions protéiques* au cours de la maturation. Un tel travail a été réalisé sur la poire *Passe-Crassane* (PECH *et al.*, 1970 *b*). C'est dans le même but que FRENKEL *et al.* (1968), grâce à la technique d'extraction de CLEMENTS, ont étudié l'incorporation d'acides aminés marqués dans des fractions protéiques de poires *Bartlett*.

Ces techniques permettent également de détecter diverses enzymes. Dans ce travail, nous avons mis en évidence plusieurs *enzymes amylolytiques* dans les fruits étudiés. L'existence d'un potentiel amylolytique à activité intense peut paraître sur-

prenante dans des fruits tels que l'orange. En effet, un équipement enzymatique important se trouve présent dans la pulpe alors que ce fruit, à l'inverse de la banane ou de la pomme, ne contiendrait que des traces d'amidon au cours de son développement ; celles-ci disparaîtraient par la suite (SINCLAIR, 1961). Selon certains auteurs, l'orange ne renfermerait même jamais d'amidon (SINCLAIR et BARTHOLOMEW, 1937). On sait toutefois que dans les conditions particulières de la culture *in vitro*, les tissus d'orange sont capables de synthétiser de l'amidon (KORDAN, 1969). La présence, démontrée dans cette étude, d'un système amylolytique chez l'orange, apparaît donc plus plausible.

Le même raisonnement ne peut être appliqué au raisin qui possède, comme l'orange, des traces d'amidon à certaines périodes de sa croissance. Ce fruit a donc perdu son équipement d'enzymes amylolytiques ou bien n'en a jamais été pourvu. Dans le dernier cas, la disparition de l'amidon aurait lieu grâce à des enzymes non détectées ici.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a été utilisée par les systématiciens dans le but d'établir des parentés biochimiques entre certaines plantes. A notre avis, de semblables recherches portant sur des fruits d'origine géographique et écologique différente seraient certainement utiles.

On sait, d'autre part, qu'à l'intérieur d'une même espèce les diverses variétés possèdent des caractéristiques technologiques variées. Il est probable qu'une meilleure connaissance de l'équipement enzymatique des fruits pourrait permettre d'expliquer de telles différences. Citons, à titre d'exemples, les pommes et les poires qui, selon la variété, doivent être conservées dans des conditions précises de température, se montrent plus ou moins sensibles à des perturbations du métabolisme conduisant à des maladies physiologiques telles que le brunissement.

En outre, certaines conditions d'entreposage déterminent une maturation anormale. Il en est ainsi des poires *Passe-Crassane* produites dans le nord de la France, mises immédiatement à mûrir à 12°, qui conservent longtemps des quantités appréciables d'amidon (ULRICH et PAULIN, 1957). L'étude des enzymes amylolytiques s'avérerait dans ce cas d'un grand intérêt.

Cependant, l'intérêt majeur de cette étude réside dans l'obtention de fractions protéiques bien individualisées susceptibles d'être purifiées et étudiées séparément. De tels travaux sont actuellement poursuivis au laboratoire.

CONCLUSION

La méthode d'extraction des protéines, précédemment utilisée pour la poire *Passe-Crassane*, a été appliquée avec succès à des fruits très divers.

Les électrophorégrammes obtenus après séparation des protéines en gel de polyacrylamide présentent de grandes différences selon les diverses espèces. Dans les limites de notre échantillonnage, leur seul examen suffit à déterminer l'espèce analysée.

Le nombre des enzymes amylolytiques mises en évidence est très variable. Dans le cas du raisin, aucune n'a été décelée ; par contre, il en existe 4 ou 5 chez les pommes et les poires.

Au terme de cette étude, nous disposons d'une méthode permettant de bonnes séparations des protéines et en particulier des enzymes de nombreux fruits. Des travaux sont actuellement en cours pour isoler et caractériser certains de ces composés.

Reçu pour publication en septembre 1970.

SUMMARY

SEPARATION OF SOLUBLE PROTEINS FROM DIFFERENT TYPES OF FRUIT, DETERMINATION OF ENZYMES WITH AMYLOLYTIC ACTIVITY

The proteins of various types of ripe fruits were separated by polyacrylamide gel electrophoresis. Their proteinograms and their densitometric recordings greatly differed.

The detection of amylolytic enzymes in gel revealed that their number varies mainly according to the studied fruit species. No such enzyme was found for instance in grapes, whereas 3 to 5 different ones exist in apple and pear.

RESUMEN

SEPARACION DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DE DISTINTOS GENEROS DE FRUTAS. PUESTA EN EVIDENCIA DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD AMILOLITICA

Las proteinas de frutas maduras muy diversas han sido separadas por electrofóresis en gel de poliacrilamida. Los proteinogramas y los registros densitométricos de los mismos presentan importantes diferencias.

La detección de enzimas amilolíticos en gel ha permitido demostrar que su número varía esencialmente según la especie de la fruta considerada. Por ejemplo, no ha sido posible descubrir ninguna en la uva, mientras que se conoce la existencia de 3 à 5 en la manzana o en la pera.

RIASSUNTO

SEPARAZIONE DELLE PROTEINE SOLUBILI DI FRUTTA VARIA. MESSA IN EVIDENZA DI ENZIMI CON ATTIVITA'AMILOLITICA

Le proteine di frutta matura di varie specie sono state separate mediante elettroforesi in gelo di poliacrilamide. I proteinogrammi e le loro registrazioni densitometriche presentano grandi differenze.

Il rilevamento di enzimi amilolitici in gelo ha permesso di mostrare che il loro numero varia essenzialmente secondo la specie del frutto considerato. Nell'uva, per esempio, non ne è stato trovato alcuno, mentre ne esistono da 3 a 5 nelle mele e nelle pere.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSON J. W., 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, **7**, 1973-1988.

ANDERSON J. W., ROWAN K. S., 1967. Extraction of soluble leaf enzymes with thiols and other reducing agents. *Phytochemistry*, **6**, 1047-1056.

BARNELL H. R., 1940. Studies in tropical fruits. VIII. Carbohydrate metabolism of the banana fruit during development. *Ann. Bot.*, N. S., **4**, 39-71.

BARNELL H. R., 1943. Studies in tropical fruits. XIV. Carbohydrate metabolism of the banana fruit during storage at 53°F. *Ann. Bot.*, N. S., **7**, 1-22.

BAYLY F. C., BERG H. W., 1967. Grape and wine proteins of white wine varietals. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **18**, 18-32.

BIALE J. B., 1960. The postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits. *Adv. Food Res.* **10**, 293-354.

BREWBAKER J. L., UPADHYA M. D., MAKINEN Y., MCDONALD T., 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoretic methods and applications. *Physiol. Plant.*, **21**, 930-940.

CLEMENTS R. L., 1965. Fruit proteins : extraction and electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **13**, 390-401.

CLEMENTS R. L., 1966. Disc electrophoresis of citrus fruit proteins. *Phytochemistry*, **5**, 243-249.

DAVIS B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and applications to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.

FRENKEL C., KLEIN I., DILLEY D. R., 1968. Protein synthesis in relation to ripening of some fruits. *Plant Physiol.*, **43**, 1146-1153.

FRENKEL C., KLEIN I., DILLEY D. R., 1969. Methods for the study of ripening and protein synthesis in intact pome fruits. *Phytochemistry*, **8**, 945-955.

HANSEN 1966. Postharvest physiology of fruits. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **17**, 459-480.

HULME A. C., 1954. The relation between the rate of respiration of an apple fruit and its content of protein. II. The value of the relation immediately after picking and at the respiration-climacteric for several varieties of apples. *J. hortic. Sci.*, **29**, 98-103.

HULME A. C., 1958. Some aspects of the biochemistry of apple and pear fruits. *Adv. Food. Res.*, **8**, 297-413.

KEFFORD J. F., 1959. The chemical constituents of citrus fruits. *Adv. Food Res.*, **9**, 285-372.

KORDAN H. A., 1969. Starch accumulation in lemon fruit cultures. *Phyton*, **26** (1), 31-34.

MOSSE J., 1968. Les protéines des céréales. 49. In : *Progrès en Chimie agricole et alimentaire*. Hermann, éd. Paris.

MOYSÉ A., 1950. *Respiration et métabolisme azoté*. Hermann, éd., Paris, 210 p.

OSBORNE T. B., 1924. *The vegetable proteins*, 2nd Ed., Longmans, Green et Cand, éd. Londres, 154 p.

PECH J.-C., 1970. *Les composés azotés de la poire* Passe-Crassane *pendant la conservation. Étude particulière des protéines*. Thèse Doct. Ing., Toulouse, 109 p.

PECH J.-C., FALLOT J., 1968. Répartition des pépins et maturation de la pomme *Golden Delicious*. *Fruits*, **23** (11), 573-579.

PECH J.-C., BARDET C., FALLOT J., 1970 *a*. Extraction et séparation par électrophorèse des protéines solubles de la poire *Passe-Crassane*. *C. R. Acad. Sci.*, **270**, 1171-1173.

PECH J.-C., BARDET C., FALLOT J., 1970 *b*. Évolution des protéines solubles et de certaines enzymes dans la pulpe de poire *Passe-Crassanne* au cours de la conservation. *Physiol. vég.*, **8**, sous presse.

RIBÉREAU-GAYON G., 1966. *Étude du métabolisme des glucides, des acides organiques et des acides aminés chez* Vitis vinifera *L.* Thèse Sciences nat., Paris, 150 p.

ROCKLAND L. B., 1961. *Nitrogenous constituents in the orange*, 238, W. B. Sinclair, ed. University of California.

SINCLAIR W. B., BARTHOLOMEW E. T., 1937. Diastasic activity of orange leaves as affected by time, temperature, pH and certain zinc salts. *J. agr. Res.*, **54**, 609-619.

SINCLAIR W. B., 1961. *The orange*. 217, W. B. Sinclair ed. University of California.

SMITH A. H., 1925. A protein in the edible portion of orange. *J. biol. Chem.*, **63**, 71-73.

STEWARD F. C., FREIBERG S. R., HULME A. C., HEGARTY M. P., BARR R., RABSON R., 1960. Physiological investigation on the banana plant. II. Factors which affect the nitrogen compounds of the fruit. *Ann. Bot.* N. S., **24**, 117-146.

ULRICH R., HARTMANN C., 1967. Enzymes et maturation des fruits. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21**, 161-193.

ULRICH R., PAULIN A., 1957. Sur la physiologie de la maturation des poires *Passe-Crassane*, à diverses températures. *C. R. Acad. Agr. Fr.*, **43**, 78-81.

VAN LOON L. C., VAN KAMMEN A., 1968. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana Tabacum* var. « Sansum » and « Sansum NN ». *Phytochemistry*, **7**, 1727-1735.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (4), 323-340.

CONTRIBUTION AUX ÉTUDES SUR LES VINS ROSÉS MÉRIDIONAUX (1)

I. — La couleur. influence sur la dégustation

P. ANDRÉ, S. AUBERT et C. PELISSE

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, 84 - Montfavet
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

La couleur de différents vins rosés, plus ou moins typiques des régions méridionales, est exprimée à l'aide de deux techniques fondées sur l'exploitation des courbes d'absorption spectrophotométriques dans le visible.

D'une part, la méthode tristimulaire de la C. I. E. est la plus rigoureuse et la plus objective sur le plan visuel.

D'autre part, l'utilisation des indices de Sudraud (DO 420 et DO 520 nm) s'avère satisfaisante pour l'analyste.

La correspondance entre les résultats des deux techniques est donnée sous forme de graphiques.

La couleur des vins influence fortement la dégustation, sans qu'il y ait de relation évidente avec le caractère gustatif.

La différenciation des vins rosés, plus particulièrement ceux du type Côtes de Provence et Côtes du Rhône, ne peut être faite sur leurs caractéristiques chromatiques seules. Les couleurs des vins de la récolte 1969 évoluent dans des limites assez larges qui restent à préciser (longueur d'onde dominante : 580 à 620 nm, pureté : 10 à 40 p. 100, luminance Y = 30 à 80 p. 100).

INTRODUCTION

Un des principaux facteurs attractifs des boissons est leur aspect. Le consommateur juge la qualité visuelle d'un liquide par la teinte et l'intensité de sa coloration ; la limpidité du milieu est souvent recherchée.

(1) On assiste actuellement à un développement de la production de vins rosés secs, bien souvent d'ailleurs hors des régions traditionnellement productrices de ce type de vins. Dans une série de mémoires à paraître dans ces *Annales*, nous nous proposons de faire le point des caractéristiques des vins rosés méridionaux en fonction des cépages utilisés et des méthodes d'élaboration.

Dans le cas des vins, la couleur est un critère de sélection immédiat entre l rouges et les blancs. Les dégustateurs, même peu avertis, associent généralement caractère à celui du goût.

En effet, les pigments responsables de la teinte rouge dominante (anthocyan sont en relation avec d'autres composés de même nature polyphénolique (tani responsables en grande partie de caractères gustatifs (astringence par exempl Toutefois cette association organoleptique reste attachée à des techniques de vi fication différentes : c'est-à-dire, les vins rouges obtenus seuls par macération so riches en colorants et extraits tanniques, les vins blancs classiques ont de faib teneurs en polyphénols.

Par contre, les vins rosés, généralement issus d'une technique intermédiai couvrent un large éventail de couleur de l'orangé clair au rouge cerise franc. Malg des différences appréciables de teinte et de quantité des colorants, il est hasarde de faire le rapprochement entre ces deux éléments de distinction et les différences goût. Cependant, il apparaît que, subjectivement, le consommateur interprète so vent l'impression visuelle. Les dégustateurs-œnologues sont enclins, par exemple, faire le rapprochement vin coloré-vin tannique, avec certaines raisons. Le novice e plus objectif en ce sens qu'il apprécie l'harmonie de la coloration d'un vin sans pr juger des qualités ou des défauts gustatifs ; néanmoins, ses préférences sont souve orientées.

Les auteurs américains, plus particulièrement Ough et Amerine (1967), se so préoccupés des tendances générales dans le choix des consommateurs. Ainsi, sur u couche de population jeune (étudiants) de la région de Californie, une étude stati tique sur quelques échantillons représentatifs de la couleur de vins rosés typiques permis de dégager les quelques observations suivantes.

Le choix et la stabilité de cette préférence de couleur s'oriente vers des vins teinte rouge soutenue dont les limites chromatiques sont données de la façon suivant

Luminance ou brillance : 35 à 50 p. 100 (transmission moyenne)
Longueur d'onde dominante : 595-620 nm (teinte rouge vermillon)
Pureté ou saturation : 25 à 40 p. 100 (couleur rouge franche).

Nous avons là une indication précise qui peut guider la préparation des vi rosés. Soulignons bien toutefois que ces conclusions ne sont valables que pour l conditions particulières de cette expérimentation. Il est bien évident que les pré rences peuvent être changées dans des régions où les habitudes alimentaires d consommateurs sont différentes.

En France, bien qu'aucune étude rigoureuse de ces problèmes de marché n'a été entreprise, le négoce indique une tendance vers les vins rosés du type tuilé pelure d'oignon, c'est-à-dire vers des couleurs plus jaunes et aussi plus claires que l caractéristiques précédentes.

Tous ces éléments pratiques, qui peuvent conditionner la commercialisati et par suite l'élaboration des vins rosés, posent plusieurs problèmes d'ordre scien fique aux technologues.

1. Il faut mesurer de façon précise la couleur des vins rosés :

— d'une part, à l'aide de techniques rigoureuses, afin de déterminer des limit assez étroites, semblables aux données des auteurs américains. La méthode trist

mulaire connue, de la Convention Internationale de l'Éclairage (C. I. E.), a toutefois l'inconvénient d'être d'application assez longue, délicate et seulement à la portée des chercheurs disposant d'un appareillage coûteux ;

— d'autre part, il est nécessaire d'utiliser de façon courante ces techniques, donc de les simplifier le plus possible, en conservant une représentativité suffisante.

Il est intéressant de faire le rapprochement de la méthode objective de la C. I. E. avec des indices colorimétriques communs, en particulier ceux de SUDRAUD (1958), afin de permettre à tous les laboratoires sommairement équipés d'utiliser le critère couleur pour sélectionner de façon significative les vins rosés.

2. On peut essayer de préciser l'importance relative du facteur couleur dans l'appréciation globale de la qualité d'un vin rosé en dégustation. Peut-on mettre en évidence une relation entre la couleur et le goût pour ce type de vin?

3. Quels sont les facteurs qui conditionnent le plus la couleur des vins rosés : les cépages ou les techniques d'élaboration ?

Sur un autre plan, le coupage vin rouge — vin blanc peut-il être décelé ?

Toutes ces questions ne peuvent être abordées dans le cadre de cette première publication ; elles feront l'objet d'études particulières qui suivront.

4. En définitive, la couleur est-elle un critère valable en vue de cataloguer les vins ; c'est-à-dire, peut-elle être caractéristique de certaines productions et quel est son intérêt dans la définition des vins rosés sur le plan législatif (ANDRÉ, AUBERT, 1970) ?

Toutes ces questions ont été abordées par des mesures effectuées sur des vins rosés de régions traditionnellement productrices : les Côtes de Provence et les Côtes du Rhône.

Dans ce premier mémoire, nous nous sommes limités à situer quelques vins rosés méridionaux sur le plan couleur, en confrontant, d'une part, la méthode tristimulaire et, d'autre part, la technique plus usuelle à l'aide des indices de SUDRAUD.

Ensuite, sur une sélection de vins dont toutes les caractéristiques sont données, on a essayé de dégager l'influence relative de la couleur sur la dégustation.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — *Échantillonnage*

Les vins rosés ont été fournis par des organismes professionnels, ainsi que par quelques producteurs qui ont accepté une expérimentation dans leurs caves. Les échantillons correspondent à une répartition géographique assez étalée dans les régions méridionales. Ils sont représentatifs de la récolte 1969, des cépages et des techniques les plus courantes.

Les prélèvements ont été faits au niveau de la cave, soit en bonbonnes, soit en bouteilles ; ils n'ont subi aucun traitement susceptible de modifier leur couleur originelle (en particulier stabilisation par de fortes additions d'anhydride sulfureux).

Les analyses courantes ont été effectuées, pour la plupart, quelques jours après la fin de fermentation.

Les mesures de couleur ou les dosages de composés polyphénoliques ont été étalés sur trois semaines pour les Côtes de Provence et Côtes du Rhône, en les regroupant par séries comparables.

Les échantillons ont été maintenus autour de + 5°C en chambre froide, entre leur réception et leur mesure, afin de stabiliser leur évolution.

B. — *Mesures de couleur*

La méthode tristimulaire de référence adoptée par l'Office International du Vin (1964) est celle des ordonnées sélectionnées de Hardy (1936) ; elle a été justifiée par Pires-Martins (1963) et de nombreux auteurs (Cuisa et Barbiroli, 1967 ; Teodorescu et Alexiu, 1968). Le calcul des coordonnées chromatiques et les déterminations graphiques ont été faites à l'aide du livre *Handook of Colorimetry* de Hardy (1936). L'illuminant C utilisé correspond théoriquement à la lumière du jour d'un ciel couvert.

Dans le cas des vins rosés, on a vérifié que la technique usuelle à 10 ordonnées sélectionnées pour chaque stimulus est suffisante, compte tenu, d'une part, de la variabilité des mesures sur un même échantillon (évolution relativement rapide après ouverture à l'air ambiant) et, d'autre part, des écarts peu significatifs avec la technique de référence à 30 ordonnées.

La couleur est mesurée à travers 10 mm d'épaisseur de vin rosé rendu parfaitement limpide par centrifugation pendant 3 minutes à 3 000 *g*, après refroidissement à 0° + 5°C à l'abri de l'air.

Dans le cas de vins rosés fortement colorés, on a utilisé une cuve de 1 mm, mais les calculs ont ramené les coordonnées trichromatiques à une épaisseur standard de 10 mm (sauf précision dans le texte). L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Beckman, type DK 2 A, à double faisceau et enregistreur automatique en transmission ou en densité optique. Le tracé des courbes est étalé sur 24 cm entre 400 et 700 nm ; ceci permet de faire un relevé précis et rapide à l'aide d'une grille de longueurs d'ondes sélectionnées.

Les calculs sont effectués à l'aide d'une machine électronique Casio type AL 1 000, sur laquelle on peut programmer les opérations élémentaires de détermination de la chromaticité.

Pratiquement les valeurs chromatiques d'un vin rosé ont pu être établies en moins de 45 minutes après ouverture de l'échantillon et 20 minutes après enregistrement de la courbe.

Sur les mêmes courbes spectrophotométriques, on a porté les indices de Sudraud (1958) qui permettent communément d'exprimer :

$$\text{l'Intensité colorante} \quad : \text{DO } 420 \text{ nm} + \text{DO } 520 \text{ nm}$$

$$\text{la Teinte (ou Nuance)} : \frac{\text{DO } 420 \text{ nm}}{\text{DO } 520 \text{ nm}}.$$

Ces valeurs indiquent sommairement la richesse en chromophores jaunes par rapport aux chromophores rouges ; le quotient est d'autant plus élevé que le vin a une teinte plus jaune (si le rouge prédomine, il est plus correct de parler de « nuance » jaune).

On a cherché à confronter cette expression numérique de la teinte avec la longueur d'onde dominante (ou plutôt longueur d'onde équivalente) donnée par la méthode tristimulaire ; lorsque cette dernière tend vers le jaune, elle diminue (650 nm = rouge, 570 nm = jaune).

La luminance ou brillance donnée par le stimulus Y (dans le vert) peut être assimilée à la transmission moyenne de la courbe entre 470 et 630 nm.

Il existe une corrélation positive entre le logarithme de $\frac{1}{Y \text{ p. } 100}$ et l'intensité colorante précédente (DO 420 + DO 520) d'après Ough, Berg et Chichester (1962) ; nous avons vérifié sa signification dans le cas des vins rosés.

Sur les diagrammes chromatiques on a positionné, d'une part, deux vins blancs, l'un de teinte jaune clair, l'autre plus foncé ; d'autre part, deux vins rouges, dans un cas, un *Grenache noir* tuilé et, dans l'autre, un *Carignan noir* de teinte pourpre classique (on a rapporté les mesures effectuées sur une épaisseur de 1 mm de vin rouge, l'expression de la couleur vue à travers 10 mm manquerait de sensibilité ; théoriquement on arrive à une saturation de 100 p. 100, c'est-à-dire que l'on bute contre la ligne de *spectrum locus*). La confrontation vin rouge-vin rosé, dans le trièdre des couleurs, devrait donc tenir compte d'une luminance 10 fois plus faible.

C. — *Évaluation des constituants polyphénoliques des vins rosés*

Les méthodes utilisées sont directement inspirées des travaux de Ribéreau-Gayon et Stonestreet (1965, 1968) sur les anthocyanes et tanins des vins rouges, ainsi que de recherches personnelles sur les vins blancs (Flanzy, Aubert, 1968).

Les techniques usuelles adoptées ont été décrites et justifiées dans une publication récente (Aubert, 1970).

D. — *Dégustation*

Divers vins rosés dont les caractéristiques chromatiques avaient été choisies assez différentes, en teinte et en intensité, ont été soumis à deux jury. Les dégustateurs étaient, dans un groupe I, des professionnels : 4 courtiers en vins et négociants, 4 œnologues et chercheurs ; dans un autre groupe II : 4 personnes non compétentes et 2 chercheurs. Trois vins étaient communs aux 2 séries.

Les deux groupes ont eu à noter et à classer par ordre de préférence, sur le plan gustatif uniquement, les échantillons numérotés dont on avait masqué la couleur (verres colorés et éclairage en lumière rouge). Les mêmes échantillons ont été ensuite présentés dans les conditions habituelles de dégustation, mais dans un ordre différent. Les vins ont alors été classés d'abord sur le plan couleur seule, puis sur les qualités gustatives et olfactives.

RÉSULTATS

Les caractéristiques chromatiques de quelques vins rosés, parmi les plus représentatifs des Côtes de Provence et des Côtes du Rhône, sont données dans les figures 1 et 2. Le diagramme de chromaticité (fig. 1) est complété par la coordonnée luminance (fig. 2) ; on retrouve ainsi la représentation spatiale de la couleur, en accord avec les théories actuelles de la perception visuelle (Bouma, 1949 ; Mellon, 1950 ; Le Grand, 1960 ; Mac Kinney, 1954-1962).

La figure 3 permet de situer sous une forme ponctuelle la couleur d'un vin à l'aide des indices de Sudraud (1958) ; cette schématisation, utilisée par Marteau et Olivieri (1965), puis par Roson (1967) sur les vins rosés, nous est apparue avoir certaines analogies avec le diagramme de chromaticité précédent, d'où son intérêt pour des laboratoires ne pouvant utiliser la technique tristimulaire.

Les corrélations entre les deux méthodes se révèlent de façon significative sous forme de diagrammes de dispersion entre les données choisies (fig. 4 et 5).

L'analyse complète des vins soumis à la dégustation et les résultats de celle-ci sont rapportés dans les tableaux 1 et 2.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ET CONCLUSION

A. — *Différenciation des couleurs des vins rosés*

Pour la récolte 1969 et les échantillons examinés, le diagramme de chromaticité (fig. 1) donne une répartition des points qui appelle quelques remarques :

1° la grande majorité des vins rosés se regroupe dans une zone limitée d'allure incurvée (longueur d'onde dominante 580-700 nm, saturation 10 à 40 p. 100) ;

2° la saturation (ou pureté d'une teinte) est d'autant plus élevée que la longueur d'onde dominante augmente.

De plus, la figure 2 montre une corrélation négative significative entre la saturation et la luminance ; pour une teinte identique, lorsque la pureté de couleur augmente, la transparence du milieu diminue.

Pratiquement, ces observations révèlent que, dans le cas des vins rosés, lorsque l'intensité de couleur croît, en général, la teinte évolue vers les rouges francs tirant

vers les pourpres. Inversement, les vins les plus clairs ont une teinte jaune plus marquée.

En effet, dans le cas des vins rosés méridionaux, vue sous l'angle vinification une meilleure extraction des pigments polyphénoliques entraîne fréquemment des nuances moins tuilées. Les vins les plus rouges ont été obtenus par « saignée » c'est-à-

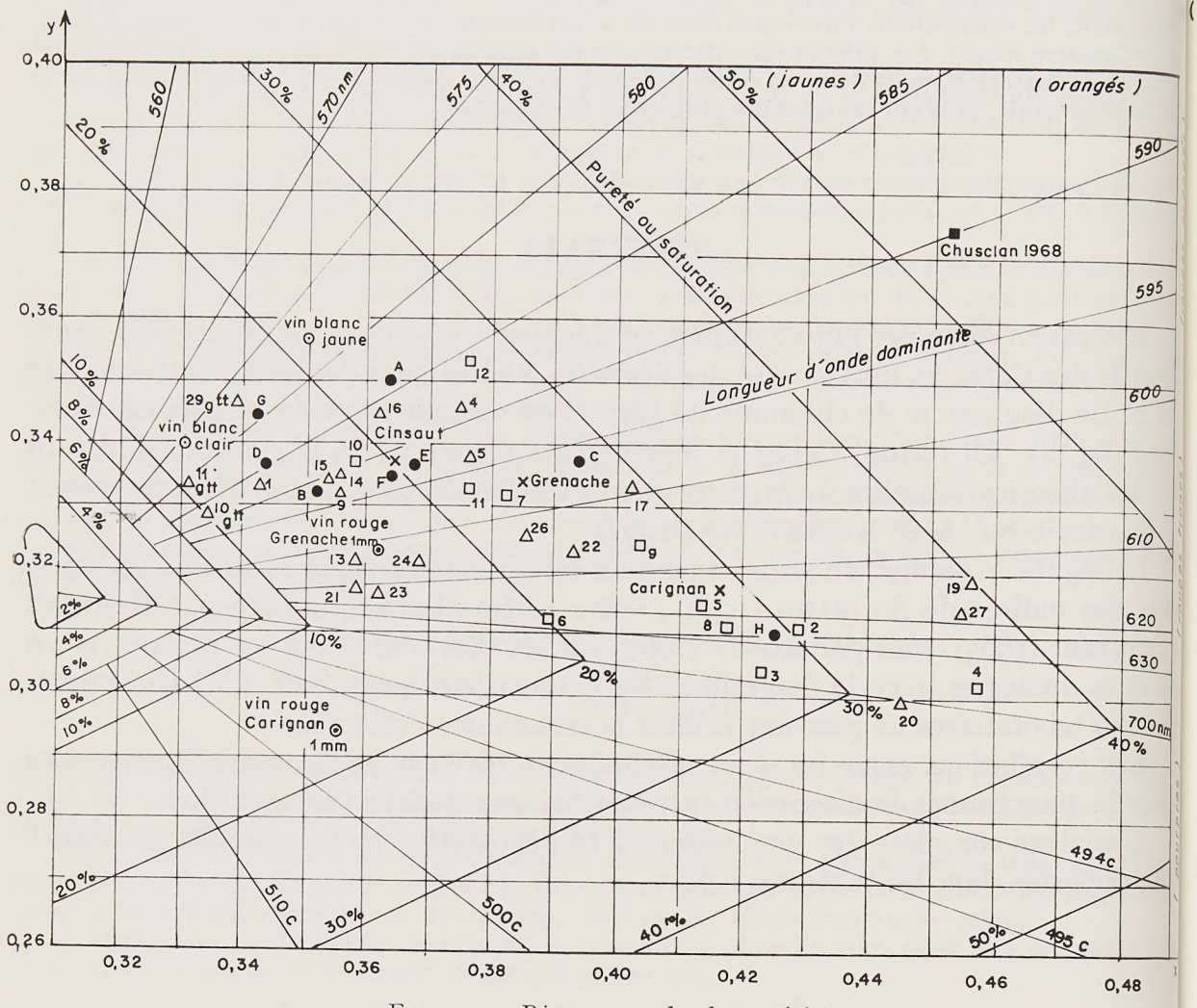


Fig. 1. — *Diagramme de chromaticité*
Δ Vins rosés Côtes de Provence
□ Vins rosés Côtes du Rhône (saignée)
● Échantillons soumis à la dégustation
× Cépages purs obtenus par pressurage direct
(Échantillons élaborés dans les mêmes conditions)

dire par une courte macération ; les vins les plus jaunes proviennent de moûts de goutte (échantillons 10, 11 et 29) de la vendange foulée, sans les jus de pressurage. Mais, il est bien évident que la couleur est aussi fonction de chaque matière première et plus particulièrement des cépages utilisés.

Les remarques générales précédentes peuvent être faites sur le diagramme (fig. 3) utilisant les indices de Sudraud (Roson, 1967).

La figure 3 révèle une répartition hyperbolique qui traduit une teinte d'autant plus rouge que l'intensité colorante est forte.

Près de 50 p. 100 des vins se situent dans les limites du rapport DO 420/DO 52 de 0,8 à 1,2 ; c'est-à-dire une nuance jaune nettement perceptible. Plus de 25 p. 10

des vins ont une teinte rouge franche avec une intensité colorante (DO 420 + DO 520) supérieure à 0,800 ; la très grande majorité dépasse 0,500, soit une transmission moyenne ou luminance inférieure à 75 p. 100 (calcul effectué sur le diagramme de la figure 4).

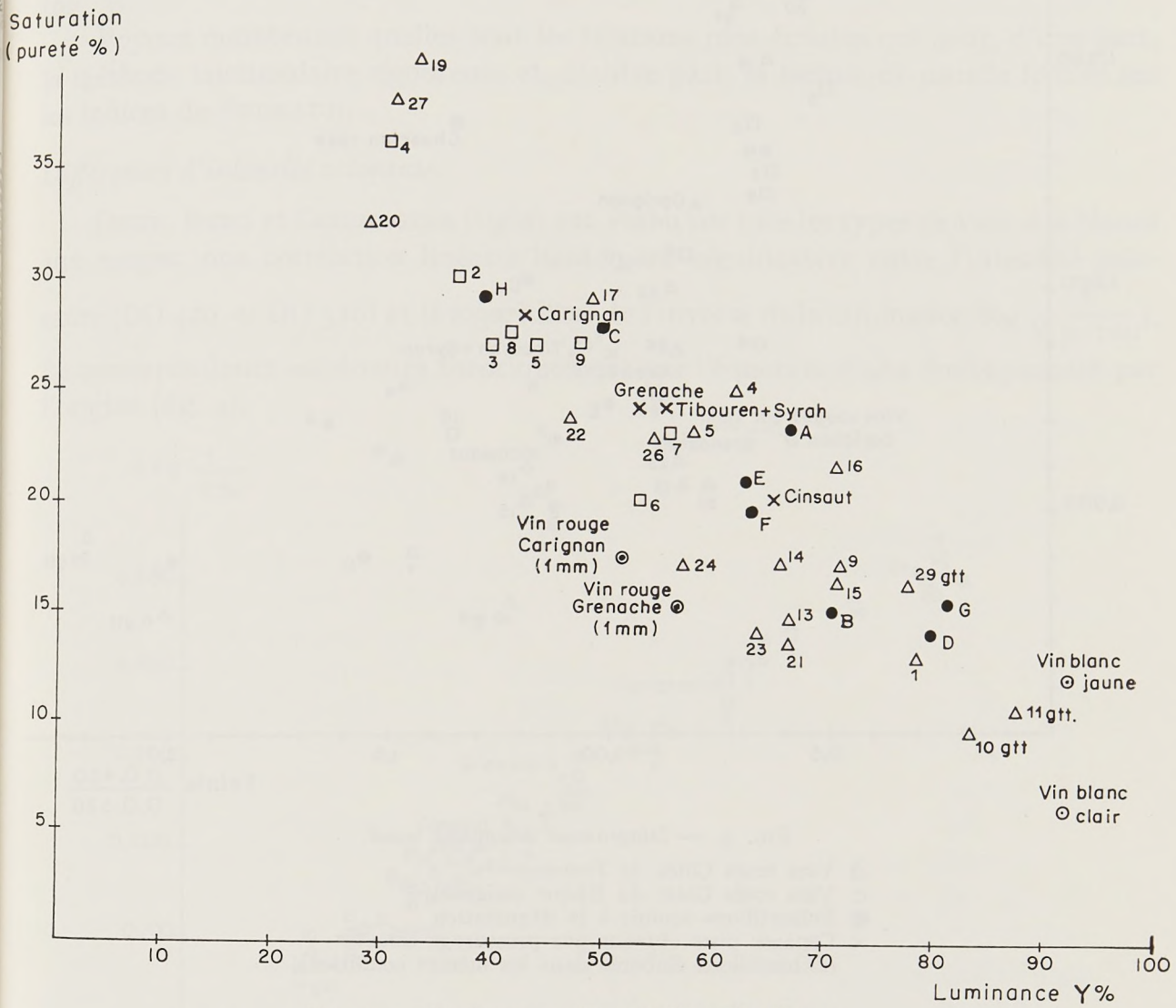


FIG. 2. — *Couleurs = chromaticité + luminance.*
(Chromaticité = teinte + saturation)
Δ Vins rosés Côtes de Provence
□ Vins rosés Côtes du Rhône (saignée)
● Échantillon soumis à la dégustation
× Cépages purs obtenus par pressurage direct
(Échantillons élaborés dans les mêmes conditions)

Il est curieux de noter qu'une étude effectuée sur la couleur de vins rosés commerciaux, français et américains, par ROBINSON, BERTINO, WHITCOMBE (1966) donne pour les échantillons signalés (Bandol, Côtes de Provence, Lirac et Tavel en particulier) des luminances comprises entre 72 et 89 p. 100 et une saturation de 14 à 40 p. 100. Ces vins sont, en général, des rosés clairs avec une nuance jaune marquée, mais on peut penser que ces échantillons avaient été stockés une longue période avant mesure (récoltes 1959 à 1962).

Nos résultats portent sur des vins jeunes qui évolueront, en se dépouillant, vers des couleurs plus claires, vraisemblablement du même ordre que les données précédentes si le vieillissement était semblable.

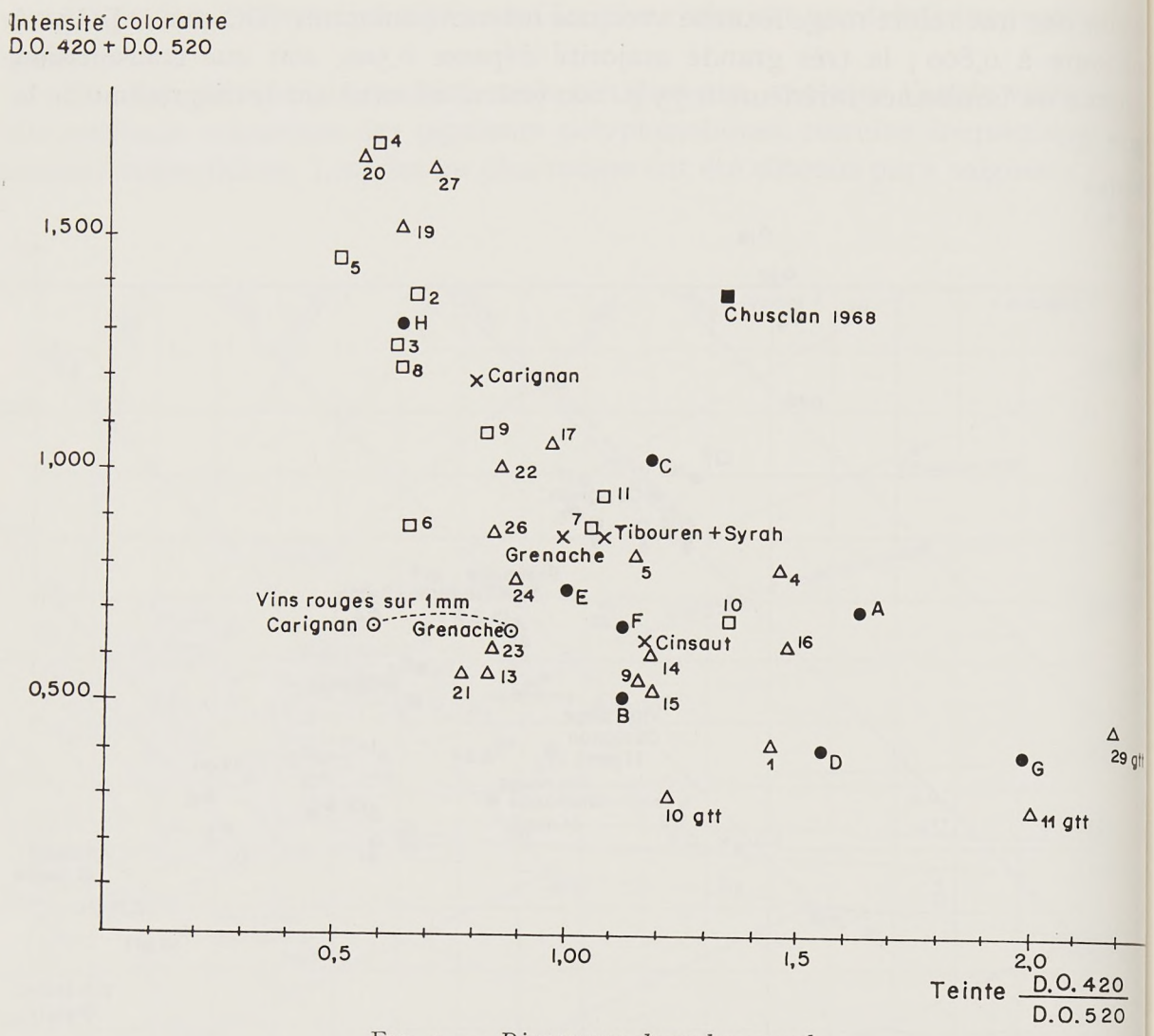


FIG. 3. — *Diagramme de couleur usuel.*

Δ Vins rosés Côtes de Provence
□ Vins rosés Côtes du Rhône (saignée)
● Échantillons soumis à la dégustation
× Cépages purs obtenus par pressurage direct
(Échantillons élaborés dans les mêmes conditions)

Toutefois, plus de 60 p. 100 des vins rosés méridionaux analysés se situent directement dans la zone de couleur des vins d'Anjou les plus appréciés, d'après la sélection de ROSON (1967) ; on ne peut donc parler de caractère typique des Côtes de Provence et Côtes du Rhône. PUISSANT et LÉON (1970) ont montré récemment que 75 p 100 des vins rosés septentrionaux (régions d'Anjou et de Saumur) ont une intensité colorante comprise entre 0,3 et 0,8.

Il faut cependant souligner qu'il apparaît, sur l'ensemble des échantillons des deux origines, un léger décalage vers les teintes plus tuilées avec une intensité plus forte pour les vins rosés méridionaux. Cette dernière région bénéficie de conditions climatiques favorables à une bonne maturité ; d'où, des vendanges riches en pigments anthocyaniques. De plus, les cépages du type *Grenache, Cinsaut, Tibouren* ou *Syrah* sont particulièrement caractéristiques de cette zone de production (voir fig. 1 à 5) surtout sur le plan de la teinte.

B. — *Confrontation des deux techniques*

Les observations précédentes suffisent à montrer l'intérêt du diagramme simplifié de couleur qui donne une bonne différenciation de vins rosés d'origines voisines (fig. 3).

Voyons maintenant quelles sont les relations plus étroites qui lient, d'une part, la méthode tristimulaire rigoureuse et, d'autre part, la technique usuelle fondée sur les indices de SUDRAUD.

Différences d'intensité colorante.

OUGH, BERG et CHICHESTER (1962) ont établi sur tous les types de vins, des blancs aux rouges, une corrélation linéaire hautement significative entre l'intensité colorante (DO 420 + DO 520) et le logarithme de l'inverse de la luminance ($\log \frac{1}{Y \text{ p. } 100}$). La correspondance est donnée théoriquement par l'équation d'une droite passant par l'origine (fig. 4).

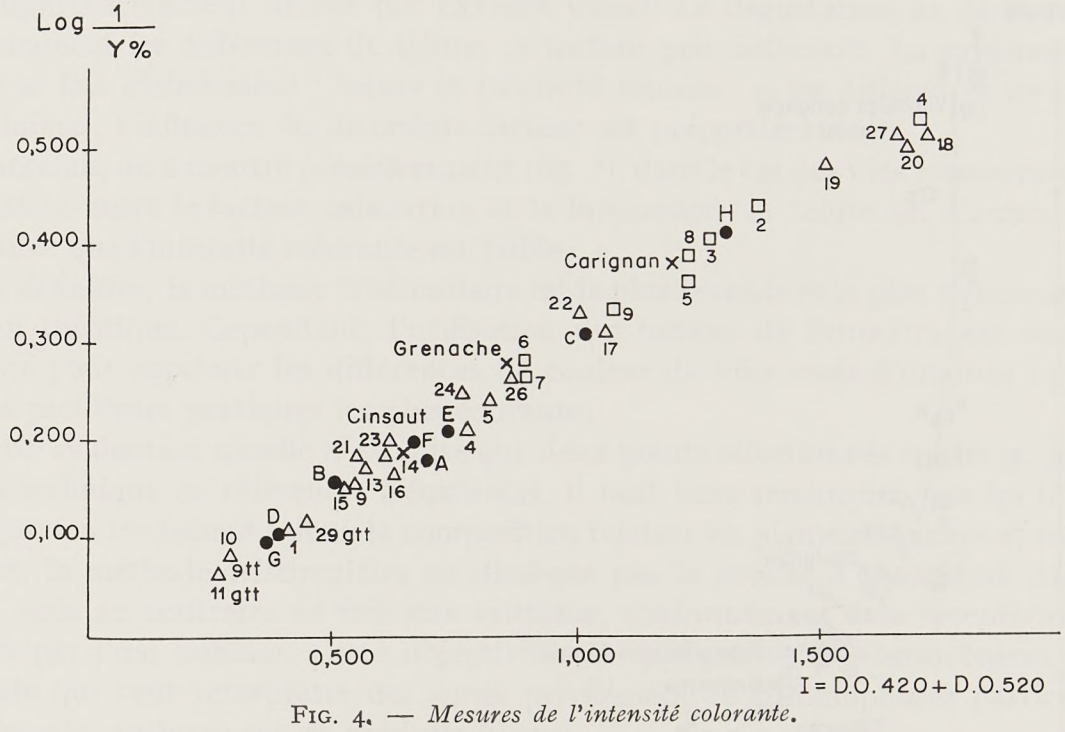


FIG. 4. — *Mesures de l'intensité colorante.*

△ Vins rosés Côtes de Provence
□ Vins rosés Côtes du Rhône (saignée)
● Échantillons soumis à la dégustation
× Cépages purs obtenus par pressurage direct)
(Échantillons élaborés dans les mêmes conditions)

Cette corrélation existe également avec les stimulus X et Z, mais elle est moins satisfaisante, surtout pour les vins très colorés à teinte pourpre ; ceci peut s'expliquer facilement si on considère les positions des 3 zones de longueurs d'ondes sélectionnées par rapport aux points 420 et 520 sur la courbe de transmission.

Pratiquement, retenons que les indices de SUDRAUD sont favorablement situés et conviennent bien pour exprimer l'intensité de couleur des vins.

Néanmoins, la figure 4 et le tableau 1 laissent apparaître de petites anomalies dans la correspondance (dispersion des points autour d'une intensité moyenne, par

exemple entre les échantillons A, E et F, surtout lorsque les teintes sont nettem différentes).

Toutefois, l'écart entre les intensités colorantes homologues de deux échantill voisins est souvent peu significatif, quelle que soit la méthode employée, dans d confrontations courantes de vins rosés. Cette erreur devrait cependant être consid dans des expérimentations très précises, par exemple pour suivre l'évolution d même échantillon ; la méthode de référence peut s'imposer pour donner une mes plus exacte de la perception visuelle.

Différences de teinte.

La relation entre la teinte, exprimée usuellement par le rapport DO 420/DO 5 et la longueur d'onde dominante, correspondance étudiée également par les aute précédents, est plus difficile à mettre en formule (fig. 5).

Dans le cas des vins rosés, on a une répartition grossièrement hyperbolique q permet de faire un rapprochement entre les deux méthodes ; néanmoins, la techniq

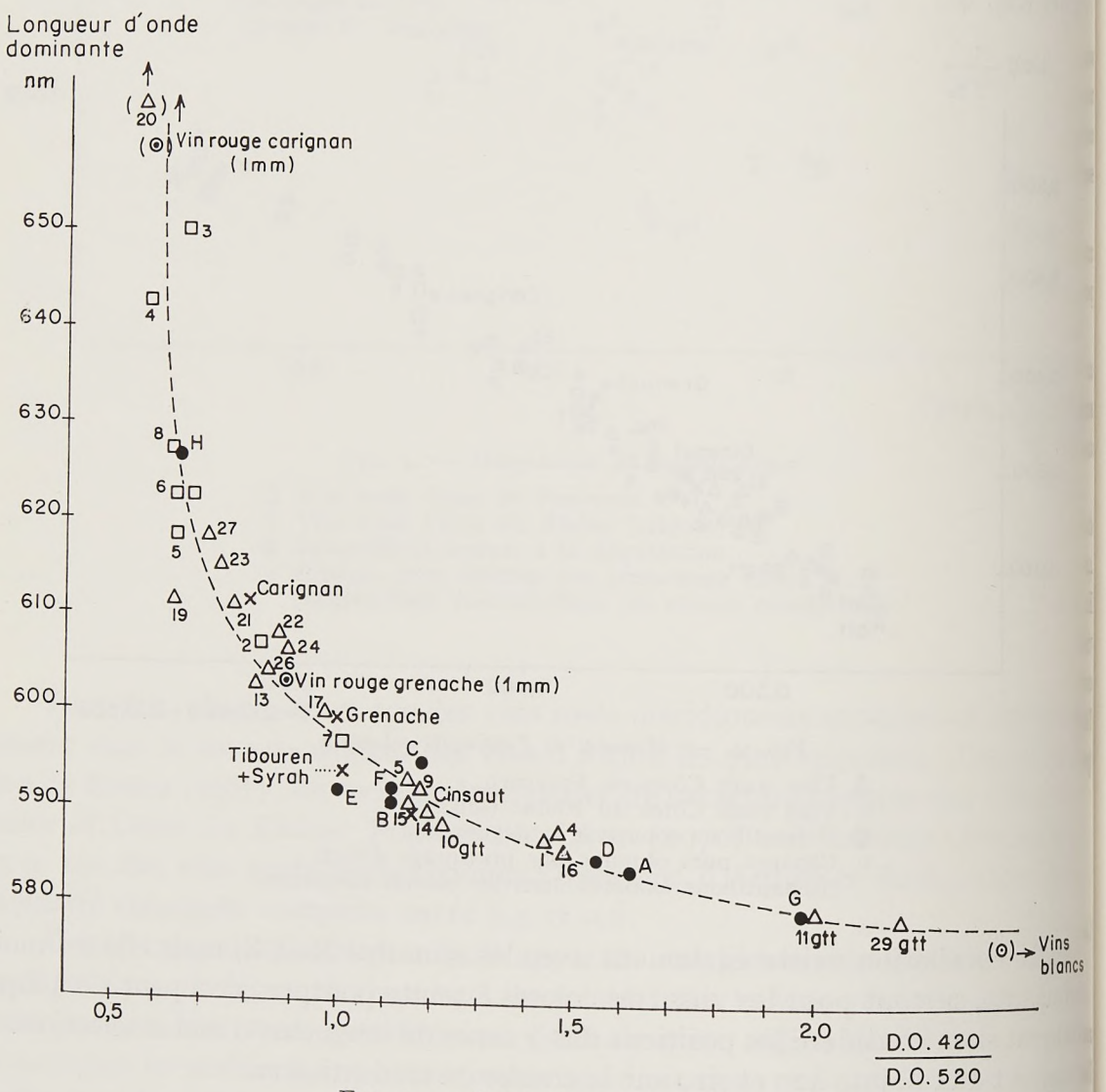


FIG. 5. — *Expressions de la teinte*

△ Vins rosés Côtes de Provence
□ Vins rosés Côtes du Rhône (saignée)
● Échantillons soumis à la dégustation
× Cépages purs obtenus par pressurage direct (Échantillons élaborés dans les mêmes conditions)

de SUDRAUD paraît ici plus aléatoire pour exprimer la teinte exacte, la dispersion des points étant plus grande.

Les échantillons B, C et F, par exemple (tabl. 1) sont théoriquement bien différenciés à l'aide de la méthode tristimulaire, tandis que les écarts du rapport $\frac{DO\ 420}{DO\ 520}$ sont minimes. En effet, la longueur d'onde dominante est voisine, mais complétée par de larges variations du facteur pureté de couleur ou saturation (fig. 1).

Néanmoins, pratiquement, la perception des teintes par un observateur standard se fait seulement pour certains intervalles plus ou moins étroits selon la zone de chromaticité, eux-mêmes fonction de la transmission de lumière.

(Le tracé des ellipses de Mac Adam, représentant dans le diagramme chromatique de la C. I. E. les couleurs juste discernables, ne peut être envisagé dans le cadre de notre travail ; les limites de ces zones de sensibilité sont représentées partiellement dans les références générales citées, en particulier : LE GRAND, 127-136 ; MAC KINNEY et LITTLE, 112-116).

Il n'est donc pas certain que des échantillons graphiquement bien distincts soient significativement définis par examen visuel. Le dégustateur ne décèlera pas nécessairement les différences de teinte, ce facteur pris isolément. La préférence de couleur se fait globalement : teinte et intensité réunies ; si les différences de teinte sont minimes, l'influence du deuxième facteur est prépondérante.

Toutefois, on a montré précédemment (fig. 2), dans le cas des vins rosés examinés, une relation entre le facteur saturation et la luminance ; la teinte est d'autant plus perceptible que l'intensité colorante est faible.

En définitive, la méthode tristimulaire est la plus sensible et la plus rigoureuse sur un plan théorique. Cependant, l'utilisation des indices de SUDRAUD est souvent suffisante pour exprimer les différences de couleur de vins rosés d'origines variées, dans les problèmes pratiques les plus courants.

Cette évaluation usuelle n'exploite que deux points sélectionnés contre 90 points dans la technique de référence. Néanmoins, il faut faire remarquer que les indices 420 et 520 nm traduisent mieux la composition relative en pigments jaunes et rouges. En effet, la méthode tristimulaire ne dissèque pas la courbe d'absorption dans le visible, mais au contraire en fait une synthèse, conformément à la réceptivité des couleurs par l'œil humain. Cette objectivité est quelquefois un inconvénient pour l'analyste qui veut interpréter des zones privilégiées de chromophores particuliers (par exemple, anthocyanes et produits bruns).

C. — *Influence de la couleur sur la dégustation* (tabl. 1 et 2)

Classement couleur.

L'intérêt respectif des deux méthodes de mesure de la couleur des vins rosés ayant été donné, on a fait une sélection d'échantillons, d'une part, en fonction de l'intensité colorante avec une teinte semblable (séries C, E, F, B ou A et D, voir fig. 3) et, d'autre part, en fonction de la teinte pour une intensité voisine (séries B, D, G et E, F, A). Toutefois, on ne peut aisément dissocier les critères personnels des dégustateurs, c'est-à-dire, la préférence d'abord sur la teinte, puis sur l'intensité ; le classement est global, sur l'harmonie de couleur d'un vin rosé.

TABLEAU I

Vins rosés des Côtes de Provence et Côtes du Rhône

N° des échantillons	A	B	C	D
Cépages (%)	*Tibouren* 42 *Cinsaut* 19 *Ugni blanc* 19 *Grenache et divers* 20	*Grenache* 45 *Cinsaut* 45 *Syrah* 10	*Grenache* 40 *Carignan* 30 *Cinsaut* 20 *Roussane* 10	*Carignan* 48 *Cinsaut* 22 *Ugni blanc* 26
Vinifications	Macér. 10 h CO_2 dans cuve	Macér. 4 à 16 h CO_2 dans cuve	Macér. 4 h CO_2 dans cuve Press. pneumat.	Press. direct. CO_2 dans cuve
Degré alcoolique (°GL)	10,8	11,8	12	11,1
Acidité totale (g/l)	4,20	4,40	3,60	4,50
Acidité volatile (g/l)	0,26	0,24	0,19	0,19
Acide malique	traces	absence	présence	absence
pH	3,40	3,40	3,30	3,20
Intens. col. (DO 420 + DO 520) ...	0,695	0,510	1,018	0,395
Teinte (DO 420/DO 520)	1,62	1,12	1,18	1,55
Coord. chromatiques x = ...	0,3633	0,3515	0,3926	0,3427
Coord. chromatiques y = ...	0,3500	0,3311	0,3382	0,3360
Long. d'onde dominante (nm).....	584	591	597	585
Facteur pureté (%)	23,5	15	28	14
Luminance (Y %)	66,55	70,5	49,65	79,7
$\text{Log } \frac{1}{Y\ \%} =$	0,182	0,158	0,309	0,104
Ind. Folin-Denis (mg ac. gallique/l).	404	300	420	300
Tannoïdes (DO 280 nm).....	1,440	1,050	1,530	1,065
Anthocyanes (mg/l)	44,5	15,3	56,3	14,1
Leucoanthocyanes (mg/l)	156	119	230	83
Leucoanthocyanes/anthocyanes	3,5	7,8	4,1	5,9
DO 550/DO 280 nm	20,6	9,7	24,8	8,8

TABLEAU I *(suite)*

Vins rosés des Côtes de Provence et Côtes du Rhône

N° des échantillons	E	F	G	H
Cépages (%)	*Grenache* 25 *Carignan* 30 *Cinsaut* 20 *Tibouren* 20 *Ugni blanc* 5	*Grenache* *Cinsaut* *Roussane*	*Grenache* 60 *Carignan* 25 *Cinsaut* 15	*Grenache* 80 *Carignan* 20 et divers
Vinifications	Macér. 12 à 24 h CO_2 dans cuve	Press. direct. CO_2 dans cuve	Press. direct.	Macération vend. éraflée
Degré alcoolique (°GL)	12	11,6	12,1	12,95
Acidité totale (g/l)	3,75	4,10	4,60	4,35
Acidité volatile (g/l)	0,32	0,21	0,22	0,23
Acide malique	absence	présence	présence	présence
pH	3,40	3,20	3,40	3,20
Intens. col. (DO 420 + DO 520)	0,736	0,665	0,387	1,302
Teinte (DO 420/DO 520)	1,00	1,12	1,98	0,644
Coord. chromatiques x =	0,3677	0,3645	0,3407	0,4246
Coord. chromatiques y =	0,3364	0,3353	0,3429	0,3120
Long. d'onde dominante (nm)	592	592	579,5	627
Facteur pureté %	21	19,5	15,2	29,0
Luminance Y %	62,65	63,85	81,0	39,25
$\text{Log } \frac{1}{Y\ \%} =$	0,208	0,199	0,096	0,410
Ind. Folin-Denis (mg ac. gallique/l)	417	605	374	435
Tannoïdes (DO 280 nm)	1,500	1,930	1,192	1,525
Anthocyanes (mg/l)	34,6	31,0	55	61,8
Leucoanthocyanes (mg/l)	192	288	198	129
Leucoanthocyanes/anthocyanes	5,5	9,3	13,2	2,1
DO 550/DO 280 nm	15,3	10,7	8,4	27,0

Le tableau 1 et les figures 1 et 3 montrent nettement que tous les échantillon classés les meilleurs ont une position centrale. Ils ont une teinte rouge tuilée (couleu rouge saumon, DO 420/DO 520 voisin de 1,1) avec une intensité moyenne (DO 42 + DO 520 de 0,500 à 1,000).

TABLEAU 2

Dégustation	Fréquence de rang										
Préférence	Vins groupe I (8 dégustateurs)						Vins groupe II (6 dégustateurs)				
Couleur masquée	A	B	C	D	E	F	A	B	C	G	H
Rang 1er	1	3	4	1	0	0	1	0	3	1	1
— 2e	0	3	1	1	1	2	2	2	1	2	0
— 3e	1	0	1	1	2	2	1	1	0	2	1
— 4e	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	1
— 5e	1	0	1	1	1	3	2	0	0	0	3
— 6e	3	1	1	1	2	0	—	—	—	—	—
Classement	**4**	*2*	1	3	**5**	**6**	*3*	*4*	1	2	5
Couleur seule	A	B	C	D	E	F	A	B	C	G	H
Rang 1er	1	2	0	0	2	5	0	4	2	0	0
— 2e	0	1	1	1	3	2	2	1	3	1	0
— 3e	1	4	2	1	1	0	3	0	1	0	1
— 4e	0	1	4	2	0	0	1	1	0	3	1
— 5e	2	0	0	3	1	1	0	0	0	2	4
— 6e	4	0	1	1	1	0	—	—	—	—	—
Classement	*5*	3	4	*6*	2	1	3	*1*	*2*	4	5
Couleur visible	A	B	C	D	E	F	A	B	C	G	H
Rang 1er	1	1	0	0	4	3	0	2	4	0	0
— 2e	0	3	2	0	0	2	0	3	1	2	0
— 3e	1	0	2	1	1	2	3	0	1	1	2
— 4e	0	1	4	2	1	0	2	1	0	2	0
— 5e	1	2	0	3	2	1	1	0	0	1	4
— 6e	5	1	0	2	0	0	—	—	—	—	—
Classement	5	**3**	**4**	6	*1*	*2*	4	2	1	3	5

Classements en chiffres gras et italiques : différences peu significatives.

Le vin rosé F peut être considéré comme le plus typique. L'échantillon B d'in tensité plus faible est bien classé dans les deux groupes ; le vin C plus coloré a ét moins apprécié par les dégustateurs professionnels que dans le groupe II, où la diffé

rence B — C est peu significative. Le vin clair et de teinte jaune (G) est mieux noté que le vin très rouge (H).

Classement gustatif.

On n'observe aucune relation entre le classement couleur et celui correspondant à la dégustation des vins, leur couleur étant masquée ; l'association couleur-goût serait donc purement subjective.

Il y a un lien entre l'intensité colorante et la teneur en anthocyanes ; mais les vins à teinte allant vers le jaune ne sont pas toujours nécessairement pauvres en pigments rouges (échantillon A et Chusclan 1968) ; les chromophores polyphénoliques diffèrent (tabl. 1 et fig. 3).

Signalons que les vins rosés se distinguent par des rapports anthocyanes/tanins très variables ; cependant le classement goût n'apparaît pas sous la dépendance directe de ces deux constituants de l'extrait sec, pour les quelques échantillons examinés. Le vin rosé C, jugé le meilleur dans les deux groupes, se particularise par une acidité faible et une teneur moyenne en constituants polyphénoliques. Une faible teneur en « tanins » ou « tannoïdes » n'est pas défavorable ; l'échantillon F le plus riche est bien toléré, sans que l'on puisse fixer de limites, supérieure et inférieure, précises d'acceptation par les dégustateurs. Notons surtout que les classements sont très dispersés, pour des échantillons assez peu typés et de qualité moyenne ; ceci ne permet pas de conclure sur le plan goût de façon aussi ferme que pour la couleur.

Classement global.

Les vins E et F du groupe I ont été fortement primés par leur couleur ; les échantillons B et C sont nettement défavorisés. Le groupe II, bien que constitué en majorité de dégustateurs peu avertis, a donné une importance plus grande au facteur goût. Peut-être cette série, plus contrastée, était-elle plus facile à analyser gustativement ?

Dans la première série, les différences de goût étant difficiles à définir et peu sensibles, le classement global a vraisemblablement été conditionné par la déformation des dégustateurs professionnels qui font une association subjective couleur-goût. Les composantes de ce choix seraient à préciser.

De toute façon, lorsque la couleur plaît, la notation globale est toujours plus indulgente, s'il n'apparaît pas de défaut gustatif très marqué.

Dans le cas des vins rosés, l'influence du facteur couleur est vraisemblablement beaucoup plus grande que pour les vins rouges et probablement les blancs ; car, pour ces deux types, les différences visuelles sont moins sensibles, alors que les goûts sont plus variés. Cette remarque suppose néanmoins que les techniques de vinification en rosé et les vendanges utilisées soient comparables, ce qui apparaît le cas dans une bonne majorité pour les productions méridionales.

D. — *Caractérisation des vins rosés méridionaux* (fig. 1, 2, 3)

Pour la vendange 1969 et les échantillons analysés, on peut avancer que les vins rosés les plus fréquents dans les régions méridionales auraient potur caracéristiques chromatiques les limites approximatives suivantes (pour une épaisseur de vin de 10 mm) :

Luminance ou brillance Y = 30 à 80 p. 100
Longueur d'onde dominante = 580 à 630 nm
Pureté ou Saturation *s* = 10 à 40 p. 100

Sous une forme plus accessible au laboratoire particulier, on peut exprimer ces couleurs par les indices de SUDRAUD :

Intensité colorante (DO 420 + DO 520) : 0,500 à 1,700
Teinte ou Nuance (DO 420/DO 520) : 0,6 à 2,0

On peut rapprocher ces données de quelques chiffres trouvés dans la littérature, dans des conditions de mesures identiques (PUISSANT et LÉON, 1970).

OUGH et AMERINE (1967) trouvent pour la région de Californie les valeurs trichromatiques :

$Y = 36$ à 72,5 p. 100 ; 586 à 620 nm ; $s = 8$ à 45 p. 100

Les zones de chromaticité se recouvrent bien pour des productions très différentes ; ceci permettrait d'envisager une définition légale des vins rosés sur le plan couleur (ANDRÉ et AUBERT, 1970).

Toutefois de nombreux échantillons qui ont l'appellation « vin rosé » sortent des limites précédentes. Un cas typique dans les Côtes du Rhône est le rosé de Chusclan ($Y = 36$ p. 100, 590 nm ; $s = 55$ p. 100) dont le caractère rouge tuilé foncé est très apprécié.

De même, les rosés italiens, d'après les données de CUISA et BARBIROLI (1968), auraient un facteur pureté et une luminance élevés ($Y = 17,2$ à 64,3 p. 100 ; 579 à 594 nm ; $s = 27$ à 64 p. 100).

Ces divers éléments montrent la difficulté de situer les vins rosés entre eux et par rapport aux vins rouges ou aux vins blancs classiques.

La diversification des vins rosés est souhaitable à l'échelle commerciale pour satisfaire les goûts variés de la clientèle ; elle est discutable pour un cru et surtout une appellation d'origine contrôlée.

La pratique montre néanmoins que chaque production évolue dans un domaine de couleur qui lui est propre, lié en grande partie au vignoble et aux techniques traditionnelles.

Il revient donc à chaque région de cataloguer ses vins pour maintenir une qualité constante dans des limites chromatiques qui lui seraient plus ou moins typiques.

Sur un plan technique, cela n'apparaît pas contradictoire avec les variations annuelles de récolte (POUX et AUBERT, 1968). Car l'élaboration des rosés n'utilise qu'une faible partie du potentiel de coloration du raisin (AUBERT et POUX, 1969).

Nous montrerons ultérieurement l'influence des cépages et des techniques de vinification sur cette caractérisation des vins rosés.

Reçu pour publication en septembre 1970.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO RESEARCHES ON MERIDIONAL ROSÉ WINES

I. — COLOUR. INFLUENCE ON TASTE

The colour of different rosé wines, that are more or less typical of the meridional regions is shown with the help of two techniques based on graphs of visible spectrophotometric absorption.

One the one hand, the C.I.E. tristimulus method is the more exact and the more objective from the visual point of view.

On the other hand the use of the SUDRAUD indices (D. O. 420 and D. O. 520 nm) proves satisfactory for the analyst.

Correspondance between the two techniques is given in graphical form.

The colour of the wines strongly influences taste, without there being any clear relation with gustative character.

Differentiation of rosé wines, notably the *Côtes de Provence* and *Côtes du Rhône* types, cannot be made simply from their chromatic characteristics. The colours of the wines of the 1969 harvest are developing within a fairly wide limit which is yet to be precised (length of dominant wave : 580 to 620 nm, clearness : 10 to 40 p. 100, luminance Y = 30 to 80 p. 100).

RESUMEN

CONTRIBUCION A LOS ESTUDIOS ACERCA DE LOS VINOS CLARETES MERIDIONALES

I. — EL COLOR. INFLUENCIA SOBRE LA DEGUSTACION

El color de los distintos vinos claretes, más o menos típicos de las regiones meridionales, queda expresado por medio de dos técnicas fundadas en el empleo de las curvas de absorción espectrofotométricas en el visible.

En primer lugar, el método tristimular de la C.I.E. parece ser el más riguroso y más objetivo, desde el punto de vista visual.

En segundo lugar, la utilización de los índices de SUDRAUD (D. O. 420 y D.O. 520 nm) demuestra ser satisfactoria para el analista.

La correspondencia entre los resultados de ambas técnicas figura indicada en forma de gráficos.

El color de los vinos tiene una poderosa influencia sobre la degustación, sin que ello presente una relación evidente con el carácter gustativo.

La diferenciación de los vinos claretes, y en particular los del tipo *Côtes de Provence* y *Côtes du Rhône*, no puede ser efectuada únicamente tomando como base sus características cromáticas. Los colores de los vinos de la cosecha de 1969 evolucionan dentro de límites bastante amplios, que quedan aún por precisar (longitud de onda dominante : 580 a 620 nm, pureza : 10 a 40 p. 100, luminancia Y = 30 a 80 p. 100).

RIASSUNTO

CONTRIBUZIONE AGLI STUDI SUI VINI ROSATI MERIDIONALI

I. — IL COLORE. INFLUENZA SULLA DEGUSTAZIONE

Il colore dei diversi vini rosati, più o meno tipici delle regioni meridionali, viene espresso mediante due tecniche fondate sullo sfruttamento delle curve di assorbimento spettrofotometriche nel visibile.

Da un lato il metodo tristimolante della C.I.E. è il più rigoroso e il più obiettivo sul piano visivo.

Dall'altro lato, l'impiego degli indici di SUDRAUD (D. O. 420 e D. O. 520 nm) si dimostra soddisfacente per l'analista.

La corrispondenza tra i risultati delle due tecniche è data sotto forma di grafici.

Il colore dei vini influisce considerevolmente sulla loro degustazione, senza pero' che vi sia un rapporto evidente con il carattere gustativo.

La differenziazione dei vini rosati, in particolar modo dei vini tipo *Côtes de Provence* e *Côtes du Rhône* non puo' essere effettuata unicamente in base alle loro caratteristiche cromatiche. I colori dei vini della raccolta 1969 evolvono in limiti abbastanza larghi che restano da precisare (lunghezza d'onda dominante : da 580 a 620 nm, purezza : da 10 a 40 p. 100, luminosità Y = da 30 a 80 p. 100).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Aubert S., 1970. Contribution aux essais de définition légale des vins rosés. *C. R. Acad. Agric. Fr.* **56** (7), 428-437.

Aubert S., 1970. Méthodes usuelles d'évaluation des anthocyanes et tanins dans les vins. *Ann. Falsif. Expert. chim.* (à paraître).

Aubert S., Poux C., 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. I. Technique d'estimation d'une vendange. *Ann. Technol. agric.*, **18** (2), 93-109.

Aubert S., Poux C., 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. II. Taux de passage dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **18** (2), 111-127.

Bouma P.J., 1949. *Les couleurs et leur perception visuelle.* Dunod, Paris.

Cuisa W., Barbiroli G., 1967. La misura delle caratteristiche del colore nei vini. *Riv. Vitic. Enol.* **20** (10), 433-458.

Cuisa W., Barbiroli G., 1968. Le variazioni delle caratteristiche del colore nei vini durante la conservazione. *Riv. Vitic. Enol.*, **21** (11), 511-525.

Flanzy M., Aubert S., 1969. Évaluation des composés phénoliques des vins blancs. Étude comparée de quelques vins de *Vitis vinifera* et de cépages hybrides interspécifiques producteurs directs. *Ann. Technol. agric.*, **18** (1), 27-44.

Hardy A. C., 1936. *Handbook of colorimetry.* The Technology Press, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge.

Le Grand Y., 1960. *Les yeux et la vision.* Dunod, Paris.

Mac Kinney G., Chichester C. O., 1954. The color problems in foods. *Advances in Food Research* **5**, 301-351. Academic Press, New York.

Mac Kinney G., Little A. G., 1962. *Color of foods.* AVI Publishing Cy, Westport, Connecticut.

Marteau G., Olivieri C., 1965. Obtention et transformation biologique du moût avant fermentation. *Bull. techn. Inform.* (196), 27-46.

Mellon M. G., 1950. *Analytical absorption spectroscopy.* (Chap. 9 : Measurement and specification of color), 515-600. John Wiley and sons, New York.

Ough C., Amerine M., 1967. Rosé wine color preference and preference stability by an experienced and an inexperienced panel. *J. Food Sci.*, **32** (6), 706-711.

Ough C. S., Berg H. W., Chichester C. O., 1962. Approximation of per cent brightness and dominant wave length and some blending application with red wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **13** (1), 32-39.

Pires-Martins G., 1963. La couleur du vin. Sur la valeur exacte d'une nouvelle méthode spectrophotométrique (en portugais). *Vinea Vino*, **1** (4), 1-30. *Bull. off. internation. Vigne Vin* (Cahiers verts) Méthodes de détermination de la couleur des vins. Méthodes analytiques n° 151 (février 1964), n° 20[illegible] (avril 1966), n° 232 (juin 1967), n° 244 (août 1967), n° 272 (février 1968).

Poux C., Aubert S., 1968. Corrélations entre la constitution en composés phénoliques des vins, la température de vinification et les caractéristiques générales de l'année. *Ann. Technol. agric.*, **17** (4) 299-313.

Puissant A., Léon H., 1970. Étude de la couleur des vins rosés et rouges d'Anjou et de Saumur. *Rev. fr. Œnol.*, **37**, 13-15.

Ribéreau-Gayon P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux.* Dunod, Paris.

Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. chim. Fr.* (419), 2649-2652.

Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. anal.*, **48** (4), 188-196.

Robinson W. B., Bertino J.-J., Whitcombe J. E., 1966. Objective measurement and specification of color in red wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **17** (2), 118-125.

Roson J.-P., 1967. Recherches sur la vinification des vins rosés. *Ann. Technol. agric.*, **16** (3), 227-23[illegible]

Sudraud P., Bar M., Martinière P., 1968. Essais de définition des vins blancs tachés et des vins rosés. *Connaissance de la Vigne et du Vin* (4), 349-357.

Sudraud P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. agric.*, [illegible] 203-208.

Teodorescu S., Alexiu A., 1968. L'appréciation de la couleur des vins rouges roumains d'après la méthode trichromatique. *Rev. Hort. Vitic.*, n° spécial 7-8, 275-283.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (4), 341-351.

CONTRIBUTION AUX ÉTUDES SUR LES VINS ROSÉS MÉRIDIONAUX

II. — Importance du cépage sur la couleur et la constitution en matières polyphénoliques

P. ANDRÉ, S. AUBERT et C. PELISSE

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, 84 - Montfavet
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

La couleur des vins rosés est très fortement conditionnée par la nature des cépages. La teinte plus particulièrement est une caractéristique de chaque vendange. La technique de vinification interviendra néanmoins pour infléchir la tendance naturelle de chaque cépage à donner des couleurs plus ou moins typiques.

Ainsi, les vins rosés de *Grenache noir* auront très généralement une nuance jaune sensible et stable ; le *Carignan noir* donnera des rosés plus foncés et pourpres, dans les mêmes conditions d'élaboration.

Sur le plan gustatif et aptitude à la conservation, il apparaît que certains cépages, comme le *Mourvèdre*, apparaissent très équilibrés dans leur constitution relative en pigments anthocyaniques et matières tanniques. Le *Cinsaut* donne des vins rosés pauvres en composés polyphénoliques ; ceci pose le problème des coupages de vendanges pour obtenir une qualité souhaitée des vins rosés ; le mélange *Tibouren* 70 p. 100-*Syrah* 30 p. 100 est un exemple.

INTRODUCTION

Dans la première partie de cette étude, on a montré l'influence primordiale de la couleur sur la dégustation des vins rosés.

On pourrait penser, à première vue, qu'une vendange quelconque, mais suffisamment colorée, donne nécessairement des produits acceptables si la vinification est correctement menée à l'aide d'une technique courante. Par exemple, un cépage comme le *Carignan noir*, productif et rustique, serait potentiellement recommandable

pour faire de bon rosés ; ceci est rarement vérifié, une couleur agréable ne suffi pas à assurer un vin de « qualité ».

En réalité, la recherche précédente a été volontairement conduite sur des vin de couleurs distinctes, mais par ailleurs semblables sur le plan goût ; c'est-à-dir sans défauts trop apparents, à partir de vendanges équilibrées de cépages variés d la production méridionale traditionnelle.

Il est très probable que des vins provenant de cépages purs donneraient de analyses gustatives plus différenciées, plus typiques ; en général ils n'ont pas l'har monie des mélanges précédents.

Le but de ce travail est de révéler les caractéristiques des cépages les plus répan dus et leur influence sur les composants de la couleur et du goût ; donc, essentiell ment, d'analyser la constitution en pigments anthocyaniques et en diverses substance polyphénoliques.

L'extraction de ces matériaux du raisin est très réduite (Aubert, Poux, 196 et inégale dans la vinification en rosé. Il est impératif de préciser les conditions d passage de la matière première au produit fini pour pouvoir faire des confrontation valables. A défaut de techniques rigoureusement identiques pour traiter deux ven danges différentes, on comparera des séries d'échantillons obtenus en parallèle e faisant varier le facteur taux d'extraction dans les limites de la pratique. L'inten sité du pressurage du raisin est la variante la plus commode sur laquelle on peu agir, tous les autres paramètres étant fixes. Dans la technique par saignée, la dur de macération serait à considérer, mais pose de délicats problèmes d'échantillonnage comparatifs.

Cette expérimentation vise donc à faire apparaître les « constantes » du cépag indépendamment des techniques d'élaboration.

Il faut toutefois souligner que des teneurs relativement faibles en constituant polyphénoliques nécessitent des dosages précis qui ne sont pas toujours compatible avec une bonne spécificité. Par exemple, un indice de matières tannoïdes n'est qu grossièrement représentatif du « corps », de la « rugosité » ou « astringence » d'un vin de même, la teneur en « tanins leucoanthocyaniques » n'est qu'un petit progrès su l'indice précédent d'après nos acquisitions analytiques récentes (Ribéreau-Gayon 1968).

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

1. — *Échantillonnage*

Tous les essais portent sur des vendanges de cépages authentiques.

L'expérimentation a été faite à l'aide d'appareillage industriel au niveau des caves de pro ducteurs des régions méridionales. Des impératifs économiques d'organisation des caves parti culières n'ont pas permis toutes les confrontations souhaitables. On distinguera plusieurs essai correspondant à des pressoirs de conception différente et à des vendanges cueillies sur des vigno bles distincts.

La comparaison des caractères propres à chaque cépage ne peut donc se faire que sur u ensemble d'échantillons obtenus à des stades d'extraction du raisin différents. De même, il fau drait tenir compte, dans une expérimentation plus exhaustive, de la variabilité des vendange d'un même vignoble ou d'origines diverses (Poux, Aubert, 1968).

Essai A, sur pressoir hydraulique horizontal (Vaslin) : sur une même charge de vendang foulée de *Grenache noir*, on a prélevé une partie aliquote des différents moûts écoulés à des pres

sions croissantes. Les échantillons correspondant à chaque niveau d'écrasement de la vendange ont été vinifiés en bouteilles dans des conditions de fermentation et de traitements comparables, puis conservés à l'abri de la lumière et à basse température (+ 5°C).

Essai B, sur pressoir pneumatique à effet radial (Pneumabilpress) : deux vendanges non foulées de *Carignan noir* et de *Mourvèdre*, provenant d'un même vignoble, ont été traitées dans les mêmes conditions que précédemment.

Essai C, sur le même pressoir hydraulique horizontal (Vaslin) : quatre vendanges de *Carignan*, *Cinsaut*, *Grenache* et mélange *Tibouren* (70 p. 100) + *Syrah* (30 p. 100) provenant de la même région, ont été pressées sans fractionner les différents moûts. L'analyse porte sur les vins finis, élaborés dans la même cave de façon identique.

2. — *Mesures*

Toutes les méthodes d'analyse et les techniques de mesures ont été rapportées dans le mémoire précédent.

RÉSULTATS

Les tableaux 1 à 4 donnent les résultats d'analyse sur les vins obtenus à partir de vendanges pures de cépages authentiques, mais d'origines différentes et traités dans des conditions expérimentales voisines. La figure 1 précise l'évolution caractéristique de la couleur des échantillons liée à la nature de la vendange et en fonction de son extraction par pression.

La figure 2 différencie divers cépages sur la base de leur constitution relative en pigments anthocyaniques et en tanins leucoanthocyaniques totaux. Les échantillons de même nature du raisin se répartissent dans des zones privilégiées, par des conditions d'extraction très différentes (pression ou macération plus ou moins importantes).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

1. — *Influence du cépage sur la couleur des vins rosés*

Les différents essais réalisés permettent de faire quelques observations.

La luminance diminue (ou intensité colorante augmente) avec la pression à laquelle a été soumise la vendange ; toutefois, cette extraction est plus ou moins régulière en fonction des volumes de moûts recueillis pour une durée d'écoulement assez arbitraire et variable (tabl. 1).

Avec cette réserve sur les conditions opératoires, on remarque néanmoins qu'il faut atteindre une pression de 3 à 4 kg pour obtenir un vin rosé bien coloré (fig. 1). Dans le cas du *Grenache noir*, pour obtenir une intensité colorante de 1,000 (valeur moyenne d'un vin rosé classique) il est nécessaire de joindre tous les jus de presse au moût de goutte initial (tabl. 1), ceci malgré un écrasement énergique de la vendange au pressoir hydraulique. Dans le cas du *Carignan* et du *Mourvèdre* (essai B), l'extraction est d'allure semblable ; néanmoins, les niveaux atteints sont plus élevés. Pour se limiter à la valeur repère précédente, on pourrait théoriquement éliminer les deux derniers jus de pression.

TABLEAU I

Composition des vins d'une même vendange et obtenus par pression (Essai A)

Grenache noir (Tavel)	Vendange foulée et pompée directement sur pressoir horizontal (Vaslin)						
Pression en kg	Goutte	1	2	3	4	5	6
Volumes correspondants en hl	16	2	7	5	3	1	1
Degré alcoolique (°GL)	13,10	13,45	13,50	13,30	12,90	12,60	12,25
Sucres (g/l)	1,80	1,80	1,10	1,20	1,40	1,60	1,70
Acidité totale (g/l)	5,10	4,65	4,45	3,90	3,95	3,85	3,90
Acidité volatile (g/l)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,30	0,10	0,10
Acide malique	Présence	Présence	présence	présence	présence	présence	présence
pH	3,04	3,21	3,33	3,72	3,98	3,98	4,03
Intensité colorante (DO 420 + DO 520)	0,560	0,840	0,920	1,280	2,250*	2,650*	2,500*
Teinte (DO 420/DO 520)	1,67	1,80	2,18	1,68	1,55*	1,52*	1,55*
Longueur d'onde dominante (nm)	585	583,5	581	585	592*	593*	591*
Facteur de pureté (%)	22	35	40	44	65*	74*	72*
Luminance Y (%)	74,9	65,25	64,4	51,2	27,1*	21*	24,1*
Indice de Folin-Denis (mg acide gallique/l)	280	276	222	298	585	580	637
Tannoïdes (DO 280)	(0,910)	(1,020)	(0,900)	(1,200)	2,200	2,390	2,810
Anthocyanes (mg/l)	7,0	7,5	3,7	14,2	57	47,5	52,5
Leucoanthocyanes (mg/l)	120	62,5	25	104	472	510	550
Leucoanthocyanes/anthocyanes	17,1	8,3	6,7	7,3	8,3	10,7	10,5
DO 550/DO 280	5,05	4,9	2,8	7,8	17,3	13,25	12,5

* Mesures effectuées sur épaisseur 1 mm et ramenées à 10 mm de vin (D 0280) = Indice plus ou moins précis

Le potentiel colorant des deux derniers cépages apparaît donc plus grand que pour le *Grenache noir*.

L'essai C (tabl. 4) confirme que les vins rosés de *Carignan noir* ont les couleurs les plus intenses ; le cépage *Cinsaut* donnerait les produits les plus clairs ; les autres variétés auraient des valeurs intermédiaires.

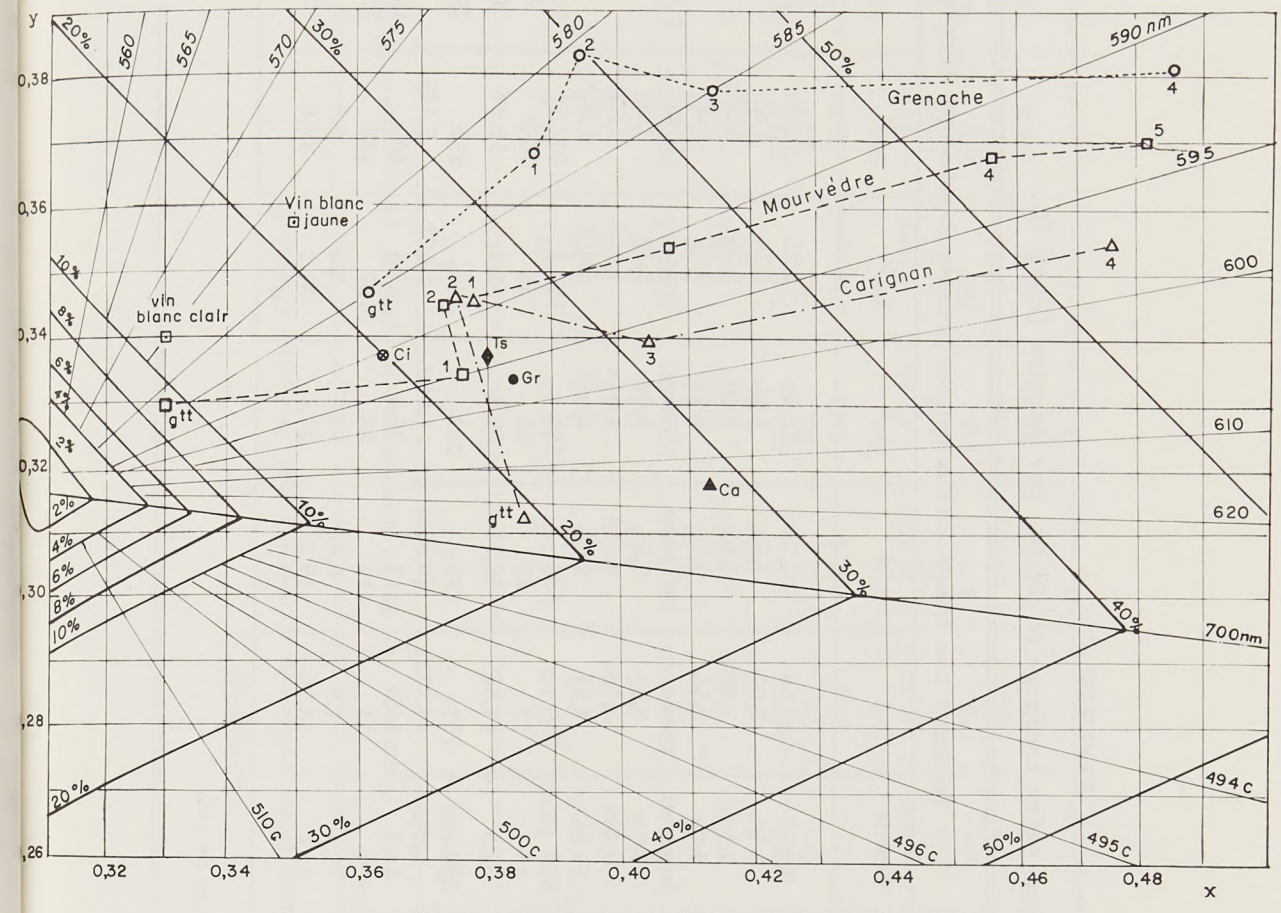


FIG. 1. — *Diagramme de chromaticité : influence du cépage et de la pression de la vendange*

La teinte, exprimée par la longueur d'onde dominante, ou le rapport DO 420/DO520, correspond à l'aspect qualitatif de la couleur.

Les tableaux 1 à 3 et le diagramme de chromaticité de la figure 1 montrent que les différents échantillons évoluent dans une zone qui serait grossièrement caractéristique du cépage. Ainsi, les vins de *Grenache noir* conservent une teinte tuilée quelle que soit la pression ; le *Carignan* donne des rosés plus pourpres ; le *Mourvèdre* aurait une longueur d'onde dominante intermédiaire. Mais, il est évident que cet éventail de teintes peut sensiblement se déplacer avec l'origine de la vendange (tabl. 4 et fig. 1).

En définitive, tous les résultats précédents confirment de nombreuses observations relevées dans la pratique dans des conditions variées.

Pratiquement, cette expérimentation prouve l'aptitude particulière de certains cépages à donner des couleurs typiques indépendamment des techniques d'élaboration. Le cas du *Grenache* est particulièrement significatif par sa dominante jaune ; le cépage *Mourvèdre* apparaît très harmonieux sur le plan couleur ; le *Carignan* permettrait d'obtenir des rosés foncés à dominante rouge pourpre.

TABLEAU 2

Composition des vins d'une même vendange et obtenus par pression (Essai B)

Carignan (Côtes de Provence)	Vendange non foulée directement sur pressoir pneumatique (Pneumabilpress)							
Niveau de pression	Goutte	1	2	3	4	5	6	7
Degré alcoolique (°GL)	12,60	12,60	12,25	12,40	12,35	12,20	12,05	12,00
Sucres (g/l)	3,75	2,07	1,52	1,45	1,75	1,65	2,75	2,15
Acidité totale (g/l)	5,10	5,30	5,15	3,60	3,50	3,20	3,00	3,40
Acidité volatile (g/l)	0,65	0,45	0,40	0,45	0,35	0,35	0,25	0,25
Acide malique	présence	présence	présence	traces	traces	traces	présence	présence
pH	3,38	3,34	3,34	3,60	3,72	3,90	4,10	4,15
Intensité colorante (DO 420 + DO 520)	0,860	0,720	0,650	1,048	1,740	2,650*	3,750*	4,000*
Teinte (DO 420/DO 520)	0,655	1,21	1,20	0,985	0,955	1,04*	1,03*	1,05*
Longueur d'onde dominante (nm)	629	589	588	596	597,5	603,5*	611*	610*
Facteur pureté (%)	19	27	25	32	54	68*	82,5*	87*
Luminance (Y %)	54,5	64,65	66,75	50,5	31,5	19,2*	10*	9,5*
Indice de Folin-Denis (en mg acide gallique/l)	300	189	180	242	336	552	780	850
Tannoïdes (DO 280)	1,265	(0,875)	(0,875)	1,060	1,423	2,125	3,220	2,720
Anthocyanes (mg/l)	46,5	16,5	17	30,4	52,5	100	157	118
Leucoanthocyanes (mg/l)	112	31	13	83	187	480	770	1 060
Leucoanthocyanes/anthocyanes	2,4	1,9	0,8	2,7	3,5	4,8	4,9	9,0
DO 550/DO 280	12,6	13,25	19,3	24,6	31,2	32,6	29,0	24,5

* Mesures effectuées sur épaisseur 1 mm et ramenées à 10 mm de vin.

TABLEAU 3

Composition des vins d'une même vendange et obtenus par pressions (Essai B)

Mourvèdre (Côtes de Provence)	Vendange non foulée directement sur pressoir pneumatique (Pneumabilpress)							
Niveau de pression	Goutte	1	2	3	4	5	6	7
Degré alcoolique (°GL)	Non ferm.	11,05	11,55	12,05	12,05	12,30	12,30	11,75
Sucres (g/l)	SO_2 excès	1,60	2,05	2,05	1,40	1,45	2,25	2,02
Acidité totale (g/l)	4,50	5,0	4,60	3,70	3,55	3,70	3,85	4,20
Acidité volatile (g/l)	0,15	0,35	0,35	0,40	0,30	0,30	0,25	0,20
Acide malique	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence
pH	3,14	3,25	3,30	3,50	3,90	3,95	3,95	4,00
Intensité colorante (DO 420 + DO 520)	0,260	0,830	0,730	1,060	1,760	2,000 *	3,000 *	3,800*
Teinte (DO 420/DO 520)	1,89	1,02	1,28	1,21	1,32	1,26	1,15 *	1,18 *
Longueur d'onde dominante (nm)	582,5	595	588	591	592	593 *	601 *	605 *
Facteur pureté (%)	9	23	25	36	53	60 *	76 *	85 *
Luminance (Y %)	87	56,1	61,4	50,8	32,5	31 *	15 *	10 *
Indice de Folin-Denis (mg acide gallique/litre)	485	262	250	404	800	600	900	1 115
Tannoïdes (DO 280 nm)	1,300	(0,970)	(0,970)	1,430	1,920	2,180	2,750	3,980
Anthocyanes (mg/l)	24,4	15	12	22,5	51,5	52,2	78	123
Leucoanthocyanes (mg/l)	—	173	212	416	635	635	900	1 560
Leucoanthocyanes/anthocyanes	—	11,5	17,6	18,5	12,3	12,2	11,5	12,7
DO 550/DO 280 nm	12,5	10,3	8,25	10,5	17,8	16,0	18,9	20,6

TABLEAU 4

Vins rosés de différents cépages
(Essai C)

Vinification (même cave)	Mêmes conditions d'élaboration après pressurage direct de la vendange foulée			
Cépages (même vignoble)	*Grenache*	*Cinsaut*	*Carignan*	*Tibouren* 70 *Syrah* 30
Degré alcoolique (°GL) ..	12,3	10,1	11,4	11,1
Acidité totale (g/l)	2,92	3,30	4,60	2,80
Acidité volatile (g/l)	0,29	0,23	0,34	0,29
Acide malique	présence	présence	présence	présence
pH	3,36	3,33	3,20	3,22
Fer (mg/l)	16	10	16	12
Intensité colorante (DO 420 + DO 520) ..	0,855	0,630	1,195	0,852
Teinte (DO 420/DO 520).	0,99	1,17	0,80	1,08
Long. d'onde dominante (nm)	597	590	613	594
Facteur pureté (%)	24,2	20,0	28,1	24,2
Luminance (Y %)	53,35	65,40	42,50	55,35
Indice de Folin-Denis (mg acide gallique/l).....	562	485	414	414
Indice orthodiphénols (*d*°)	522,5	427,5	285	342
Tannoïdes (DO 280)	1,875	1,780	1,615	1,605
Anthocyanes (mg/l)	20,2	13,8	35,8	23,4
Leucoanthocyanes (mg/l).	320	187	202	198
Leucoanth./anthocyanes .	15,85	13,55	5,64	8,45
DO 550/DO 280	7,2	5,2	14,8	9,7

2. — *Influence des différences variétales en constituants polyphénoliques*

Divers indices permettent d'exprimer la constitution des vins rosés en compos de nature phénolique ; plus particulièrement, les anthocyanes sont les pigmen rouges et les tanins leucoanthocyaniques représentent un autre groupe comple de substances tannoïdes sélectionnées.

Ces deux types de polyphénols sont apparemment sans corrélation direct ce qui a incité à utiliser leurs variations respectives comme base de différenciati des vins rosés (SUDRAUD, BAR et MARTINIÈRE, 1969 ; ANDRÉ et AUBERT, 197

Il apparaît des différences considérables en valeurs absolues et en valeurs re tives de ces indices de polyphénols. Mais, dans la caractérisation des vins rosés, faudra tenir compte de la part qui revient au cépage et celle attribuable à la techniq de vinification.

La figure 2 rassemble les résultats obtenus dans nos essais ; on peut en déduir les observations suivantes :

— indépendamment du taux d'extraction des polyphénols, les vins rosés *Carignan noir* se caractériseront par leur teneur élevée en anthocyanes ; ce

confirme le pouvoir colorant de ce cépage ; de plus, la teneur en substances tanniques est quantitativement faible ou moyenne ;

— pour une même teneur en pigments rouges, les raisins de *Grenache noir* ont plus de deux fois la teneur du *Carignan* en composés leucoanthocyaniques ; ceci peut expliquer la teinte tuilée particulière au premier cépage (les tanins condensés ou les produits d'oxydation des polyphénols donnent des chromophores bruns). JOSLYN et LITTLE (1967) ont montré que le Grenache donne des vins rosés dont la couleur et les caractères se maintiennent bien dans le temps.

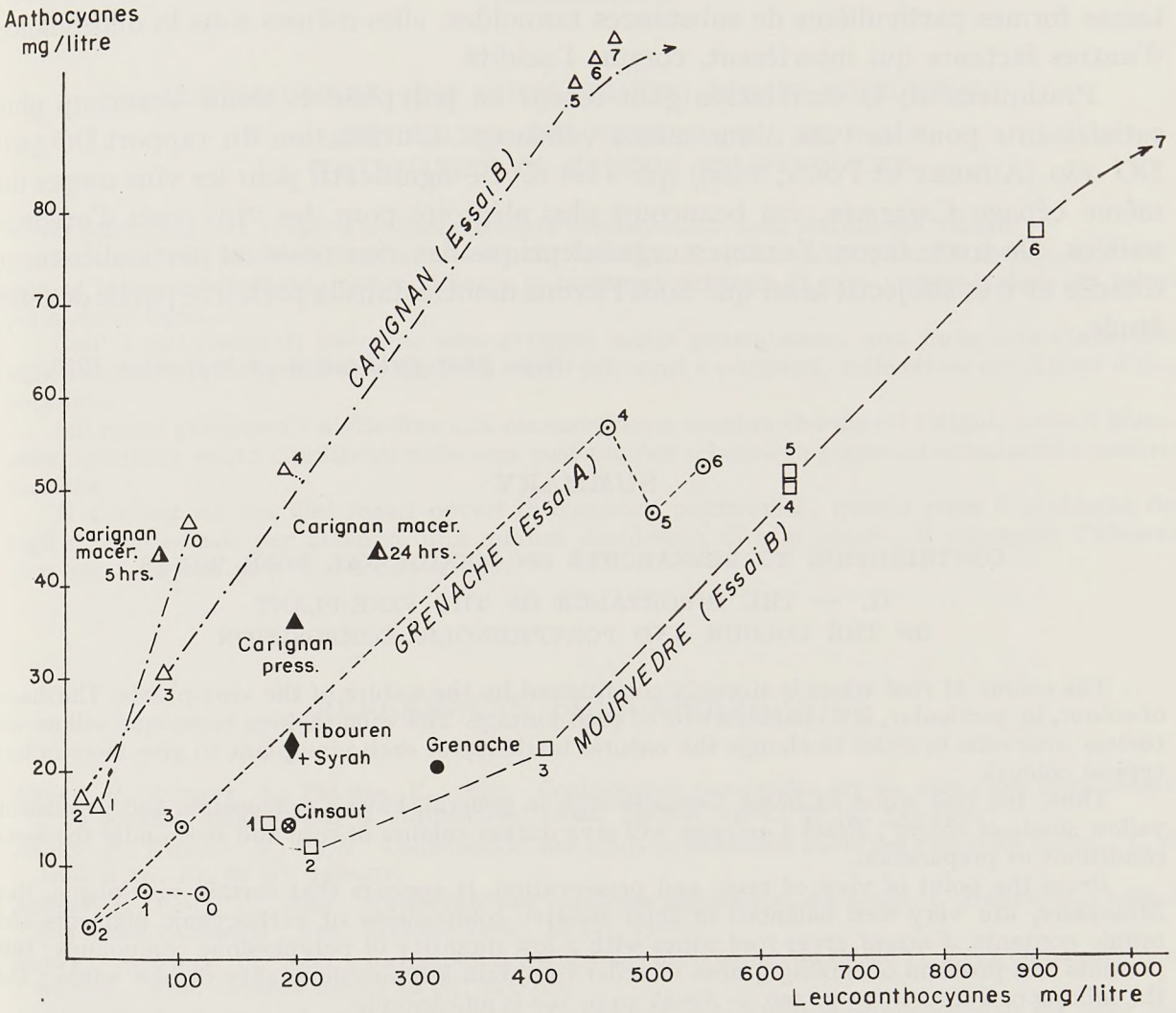


FIG. 2. — *Influence des cépages sur la composition en polyphénols des vins*

— les vins de *Mourvèdre* sont en même temps riches en anthocyanes et en tanins ; on peut penser que celà correspond à leur stabilité particulière en cours de conservation. Il faut signaler que des régions méridionales à appellations ont retenu depuis longtemps ce cépage ;

— les autres vendanges examinées auraient des valeurs moins caractéristiques ; le cépage *Cinsaut* utilisé seul donnerait, par pression directe du raisin, des vins rosés peu colorés et peu tanniques ; le mélange *Tibouren* (70 p. 100)/*Syrah* (30 p. 100) apparaît bien équilibré.

En définitive, ces deux repères de composition (anthocyanes et leucoantho-

cyanes) mettent en évidence la nécessité de faire des coupages de vendange pou obtenir des vins rosés harmonieux.

L'exploitation des autres indices de polyphénols, proposés dans les tableaux nous sont apparus moins significatifs que les précédents, mais ils peuvent corrobore les observations faites.

Sur un plan qualitatif et sous l'angle de la dégustation, on peut être étonné d la faible teneur en « tanins » des vins de *Carignan noir* ; précisons que le caractèr un peu « grossier » de ce cépage (attribué quelquefois à de l'astringence) est difficil à définir.Il est vraisemblable que le goût de ces vins est dû, en partie seulement, à cer taines formes particulières de substances tannoïdes, elles-mêmes sous la dépendanc d'autres facteurs qui interfèrent, comme l'acidité.

Pratiquement, la corrélation goût-teneur en polyphénols serait beaucoup plu satisfaisante pour les vins d'une même vendange. L'utilisation du rapport DO 550 DO 280 (AUBERT et POUX, 1969) qui s'est révélé significatif pour les vins rouges d même cépage *Carignan*, est beaucoup plus aléatoire pour des vins rosés d'origine variées. De toute façon, l'examen organoleptique des vins rosés est particulièremen difficile et très subjectif ainsi que nous l'avons montré dans la première partie de cett étude.

Reçu pour publication en septembre 1970.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO RESEARCHES ON MERIDIONAL ROSÉ WINES

II. — THE IMPORTANCE OF THE VINE-PLANT ON THE COLOUR AND POLYPHENOLIC COMPOSITION

The colour of rosé wines is strongly conditioned by the nature of the vine-plants. The shad of colour, in particular, is a characteristic of each vintage. The wine-making technique will never theless intervene in order to change the natural tendancy of each vine-plant to give more or les typical colours.

Thus, the rosé wines of *Black Grenache* will, in general, have a perceptible and permanen yellow shade of colour ; *Black Carignan* will give darker colours of rose and red, under the sam conditions of preparation.

From the point of view of taste and preservation, it appears that certain vine-plants, lik *Mourvèdre*, are very well balanced in their relative composition of anthocyanic pigments an tannic contents. *Cinsaut* gives rosé wines with a low quantity of polyphenolic compounds ; thi presents the problem of mixing grapes in order to obtain a desirable quality of rosé wines ; th the mixing of *Tibouren* 70 p. 100 — *Syrah* 30 p. 100 is an example.

RESUMEN

CONTRIBUCION A LOS ESTUDIOS ACERCA DE LOS VINOS CLARETES MERIDIONALES

II. — IMPORTANCIA DE LA VARIEDAD DE CEPA RESPECTO AL COLOR Y LA COMPOSICION EN MATERIAS POLIFENOLICAS

El color de los vinos claretes depende en gran proporción de la variedad de cepa de que pro ceden. La tonalidad, en particular, constituye una característica de cada vendimia. La técnic de vinificación intervendrá, no obstante, para marcar más o menos la tendencia natural de cad variedad de cepa a dar colores más o menos típicos.

Así, por ejemplo, los vinos claretes de *Grenache noir* poseen, muy generalmente, un matiz amarillo sensible y estable ; la variedad *Carignan noir* dará a su vez claretes más oscuros y púrpuras, en idénticas condiciones de elaboración.

Desde el punto de vista gustativo y de la aptitud a la conservación, parece que ciertas variedades de cepa, como por ejemplo el *Mourvèdre*, sean muy equilibradas en su composición relativa en pigmentos antociánicos y materias tánicas. El *Cinsaut* produce vinos claretes pobres en compuestos polifenólicos. Todo ello plantea problemas de mezcla de vendimias para obtener una calidad deseada de vinos rosados y un ejemplo de ello lo tenemos en la mezcla *Tibouren* 70 p. 100 — *Syrah* 30 p. 100.

RIASSUNTO

CONTRIBUZIONE AGLI STUDI SUI VINI ROSATI MERIDIONALI
II. — IMPORTANZA DEL VITIGNO SUL COLORE E LA COSTITUZIONE IN MATERIE POLIFENOLICHE

Il colore dei vini rosati è fortissimamente condizionato dalla natura dei vitigni.

La tinta, più particolarmente, è una caratteristica di ogni vendemmia. La tecnica di vinificazione interverrà tuttavia per modificare la tendenza naturale di ogni vitigno a dare dei colori più o meno tipici.

Cosi' i vini rosati di *Grenache nero* avranno molto generalmente una sfumatura gialla sensibile e stabile ; il *Carignan nero* darà dei rosati più scuri e purpurei, nelle stesse condizioni d'elaborazione.

Sul piano gustativo e attitudine alla conservazione, sembra che alcuni vitigni, come il *Mourvèdre*, appaiono molto equilibrati nella loro costituzione relativa in pigmenti antocianici e materie tanniche.

Il *Cinsaut* dà dei vini rosati poveri in composti polifenolici ; questo pone il problema dei tagli di vendemmie per ottenere una qualità desiderata di vini rosati ; il miscuglio *Tibouren* 70 p. 100 — *Syrah* 30 p. 100 è un esempio.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Aubert S., Pelisse C., 1970. Contribution aux études sur les vins rosés méridionaux. I. La couleur, influence sur la dégustation. *Ann. Technol. agric.*, **19** (4), 323-340.

André P., Aubert S., 1970. Contribution aux essais de définition légale des vins rosés (note). *C. R. Acad. Agric. Fr.* **56** (7), 428-437.

Aubert S., Poux C., 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. I. Technique d'estimation d'une vendange. *Ann. Technol. agric.*, **18** (2), 93-109.

Aubert S., Poux C., 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. II. Taux de passage dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **18** (2), 111-127.

Joslyn M. A., Little A., 1967. Relation of type and concentration of phenolics to the color and stability of rosé wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **3**, 138-148.

Poux C., Aubert S., 1968. Corrélations entre la constitution en composés phénoliques des vins, la température de vinification et les caractéristiques générales de la vendange. *Ann. Technol. agric.*, **17** (4), 299-313.

Ribéreau-Gayon P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris.

Sudraud P., Bar M., Martinière P., 1968. Essais de définition des vins blancs tachés et des vins rosés. *Connaissance de la Vigne et du Vin* (4), 349-357.

Ann. Technol. agric., 1970, **19** (4), 353-355.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1970

P. André, S. Aubert, C. Pelisse. — Contribution aux études sur les vins rosés méridionaux. I. — La couleur. Influence sur la dégustation 323

P. André, S. Aubert, C. Pelisse. — Contribution aux études sur les vins rosés méridionaux. II. — Importance du cépage sur la couleur et la constitution en matières polyphénoliques 341

D. Barrillon, A. Gac, G. Pierson, C. Poux. — Etude du bilan thermique d'un vinificateur continu 155

C. Bayonove, R. Cordonnier. — Recherches sur l'arôme du Muscat. I. — Évolution des constituants volatils au cours de la maturation du *Muscat d'Alexandrie* 79

C. Bayonove, R. Cordonnier. — Recherches sur l'arôme du Muscat. II. — Profils aromatiques de cépages muscat et non-muscat. Importance du linalol chez les Muscats 95

C. Bizeau, Émilienne Bizeau. — Étude de la préparation de protoplastes chez deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* hansen 131

J. Bricout. — Application de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire à l'analyse des eaux-de-vie de vin 197

Y. Chambroy, P. Ferry, C. Flanzy. — Appareil pour la mesure automatique et l'étude cinétique des échanges d'un gaz à pression et température constantes 205

C. Divies. — Action du substrat carboné sur l'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par *Acetobacter aceti* 187

C. Flanzy, P. Bénard. — Variation de la composition en cations et en acides organiques non cétoniques des pointes de turions d'*Asparagus officinalis* L. selon leur stade de maturité 53

C. Flanzy, P. Bénard, S. Aubert. — Méthode de vinification par macération carbonique. IV. — Influence de la température et de la durée de macération carbonique sur la qualité des vins secs élaborés à partir de *Grenache noir* 29

B. Godon. — Étude physico-chimique des associations protéiques du gluten de blé 17

C. Jouret, M. Moutounet. — Comparaison des substances volatiles émises au cours de la vinification de raisins foulés et non foulés 59

Suzanne Lafon-Lafourcade. — Étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins 141

A. Latrasse, A. Barret. — Entraînement par les gaz d'un composé volatil en solution aqueuse 275

J.-L. Multon, A. Guilbot. — Étude dans un milieu peu hydraté, le blé, du rôle de l'eau dans le mécanisme de dénaturation thermique de certaines protéines enzymatiques 23

Andrée Ournac. — Synthèse et couplage des deux constituants de la thiamine par la levure .....

Andrée Ournac. — Conditions d'élaboration et d'exsorption de la thiamine par la levure 28

J.-C. Pech, C. Bardet, J. Fallot. — Séparation des protéines solubles de divers fruits. Mise en évidence d'enzymes à activité amylolytique..... 31

Alice Pierre, A. Portman. — Emploi de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide pour mettre en évidence et doser le lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas des fromages 10

C. Poux, Andrée Ournac. — Acides aminés libres et polypeptidiques du vin .. 21

M. Souty, A. Perret. — Sur la dégradation thermique de la protopectine des fruits à noyau. Application à la prévision d'une dégradation donnée lors des opérations d'appertisation 4

Notes.

M. Bourzeix, J. Guitraud, F. Champagnol. — Identification des acides organiques et évaluation de leurs teneurs individuelles dans les moûts et les vins par chromatographie et photodensitométrie 6

C. Divies, J.-N. Morfaux. — Remarques sur l'induction de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* par la nitrosoguanidine..... 26

Alice Pierre, A. Portmann. — Mise en évidence du lait de vache dans le fromage de chèvre par électrophorèse de la fraction caséine. Conservation des échantillons 17

Françoise Vezinhet, A. Arnaud, P. Galzy. — Remarques sur une technique permettant une sporulation rapide des zygotes chez la levure..... 26

CONTENTS

P. André, S. Aubert, C. Pelisse. — Contribution to researches on meridional rosé wines. I. — Colour. Influence on taste 3

P. André, S. Aubert, C. Pelisse. — Contribution to researches on meridional rosé wines. II. — The importance of the vine-plant on the colour and phenolic composition 3

D. Barrillon, A. Gac, G. Pierson, C. Poux. — Wine-making. Study of the thermal balance in a continuous fermentation tank 1

C. Bayonove, R. Cordonnier. — Researches on the aroma of Muscat. I. — Development of volatile constituents during the maturation of *Muscat of Alexandria* 7

C. Bayonove, R. Cordonnier. — Researches on the aroma of Muscat. II. — Aromatic profiles of muscat and non-muscat vine-plants. The importance of linalol in the Muscats..... 9

C. Bizeau, Émilienne Bizeau. — Study of the preparation of protoplasts in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* hansen 1

J. Bricout. — Application of gas chromatography on capillary column to the analysis of brandy..... 1

Y. Chambroy, P. Ferry, C. Flanzy. — Apparatus for automatic mesure and kinetic research of a gas at constant pressure and temperature 2

C. Divies. — Influence of Carbon substrate on the oxydation of ethanol and acetaldehyde by *Acetobacter aceti* 187

C. Flanzy, P. Bénard. — Variations of the composition in cations and non-ketonic acids of asparagus tips of *Asparagus officinalis* L., according to the degree of their ripeness 53

C. Flanzy, P. Bénard, S. Aubert. — Vinification by the CO_2 maceration method. IV. — Influence of temperature and length of CO_2 maceration on the quality of dry wines made from black *Grenaches* grapes..... 29

B. Godon. — Physico-chemical study of the proteic associations of wheat gluten 17

C. Jouret, M. Moutounet. — Comparison of the volatile substances arising from the vinification of crushed and uncrushed grapes 59

Suzanne Lafon-Lafourcade. — Research on L-malic acid degradation by non-proliferating lactic bacteria isolated from wines 141

A. Latrasse, A. Barret. — Gas displacement of a volatil compound from an aqueous solution..... 275

J.-L. Multon, A. Guilbot. — Study in a less hydrated medium, such as wheat, of the part played by water in the thermal denaturation of certain enzymatic proteins..... 239

Andrée Ournac. — Synthesis and coupling of the two constituents of thiamin by yeast 5

Andrée Ournac. — Conditions for the elaboration and desorption of thiamin by yeast 285

J.-C. Pech, C. Bardet, J. Fallot. — Separation of soluble proteins from different types of fruit. Determination of enzymes with amylolytic activity.. 311

Alice Pierre, A. Portmann. — Detection of cow-milk added to goat-milk by use of polyacrylamide gel electrophoresis..... 107

C. Poux, Andrée Ournac. — Free and polypeptidic amino-acids in wine 217

M. Souty, A. Perret. — Thermal degradation of protopectin in stone-fruit. Its application in forecasting a specified degradation during appertization operations 41

Notes.

M. Bourzeix, J. Guitraud, F. Champagnol. — Identification of the organic acids and evaluation of their respective amounts in musts and wines by chromatography and photodensitometry 69

C. Divies, J.-N. Morfaux. — Note on the induction of *Saccharomyces cerevisiae* mutants in presence of nitrosoguanidine 261

Alice Pierre, A. Portmann. — Determination of the presence of cow-milk in goat-milk by electrophoresis of the casein fraction. Storage of the samples. 177

Françoise Vezinhet, A. Arnaud, P. Galzy. — Remarks on a technique allowing a quick sporulation of zygotes in yeast 267

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé :* (250 mots maximum) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusions* f) *résumé* anglais ou destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions nedoivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Œnologie et de Technologie végétale 11 - Narbonne, France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas.

On demande deux exemplaires.

Technologie agricole

Le Directeur de a publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 1-1971.

Dépôt légal: 1er trimestre 1971. N° d'impression : 1708.